



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE PARA LA
DETERMINACIÓN DE CLOROFENOLES
CONTAMINANTES PRIORITARIOS
MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE
DIODOS INTEGRADOS Y FIA**



* 5 3 0 9 8 2 3 9 3 7 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TESIS DOCTORAL

FERNANDO NAVARRO VILLOSLADA

Director:

Luis Vicente Pérez Arribas

Profesor Asociado de la U.C.M.

MADRID, 1997



Ciudad Universitaria
28040 Madrid (España)
Teléf. 394 43 31
Fax 394 43 29

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA

D. LUIS M^a POLO DIEZ, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICO: Que el presente trabajo titulado “**Calibración multivariante para la determinación de clorofenoles contaminantes prioritarios mediante espectrofotometría de diodos integrados y FIA**” ha sido realizado en este Departamento por D. FERNANDO NAVARRO VILLOSLADA bajo la dirección del Profesor D. LUIS VICENTE PÉREZ ARRIBAS, constituyendo la Tesis Doctoral de su autor.



FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA

Madrid a 8 de Enero de 1997

El presente trabajo ha sido realizado en el departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del profesor D. Luis Vicente Pérez Arribas. A él quiero expresar mi más profunda gratitud y agradecimiento por sus enseñanzas, consejos y orientaciones, gracias a los cuales, no solo ha hecho posible la realización de este trabajo, sino que ha contribuido de forma esencial al desarrollo de mi formación científica.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la profesora Dña. M^a Eugenia de León González por su generosa colaboración y su inestimable ayuda en la realización de este trabajo.

Así mismo agradezco al profesor D. Luis M^a Polo Díez, catedrático y director del Departamento de Química Analítica de la U.C.M., el haber puesto a mi disposición todos los medios necesarios para llevar a cabo el presente trabajo.

Agradezco a aquellos amigos y compañeros que, con sus orientaciones, discusiones y ayuda contribuyeron, a lo largo de estos años, a la realización de esta memoria.

Por último, muchas gracias a mi familia por su constante apoyo y todos los sacrificios que desinteresadamente han hecho por mí.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

2CF	2-clorofenol
4-AAP	4-aminoantipirina
4C3MF	4-cloro-3-metilfenol
AKF	filtro de Kalman adaptado
ANN	redes neuronales artificiales
ATP	adenosín trifosfato
BLM	métodos bilineales
BLP	método del mejor estimador lineal
CF	clorofenol
CLS	regresión clásica de mínimos cuadrados
Cond(K)	número de condición de la matriz K
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
DCF	2,4-diclorofenol
E_T^N	parámetro de Dimroth-Reichardt
ECD	detector de captura electrónica
EKF	filtro de Kalman extendido
FA	análisis factorial
FCP	fenoles contaminantes prioritarios
FIA-CM	análisis de inyección en flujo-calibración multivariante
FID	detector de ionización de llama
FSCC	columna capilar de sílice fundida
FTIR	espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
GC	cromatografía gaseosa
GLS	regresión de mínimos cuadrados generalizada
GSAM	método de adición estándar generalizado
Hy-3500	Hyamina-3500

ICP-AES	plasma acoplado inductivamente-espectrometría de emisión atómica
ILS	regresión inversa de mínimos cuadrados
KF	filtro de Kalman
LC	cromatografía líquida
L.D.	límite de detección
LRR	regresión en variables latentes
LWR	regresión local ponderada
MAC	concentración máxima admisible
MBTH	3-metil-2-benzotiazolinhidrazona
MLR	regresión lineal múltiple
MRPE	error relativo de predicción medio
MS	espectrometría de masas
MSE	error cuadrático medio
MSEE	error cuadrático medio de estimación
NAD	nicotinaminadeninucleótido
NIPALS	algoritmo iterativo no lineal de mínimos cuadrados parciales
NPD	detector de nitrógeno-fosforo
PCA	análisis de componentes principales
PCF	pentaclorofenol
PCR	regresión de componentes principales
PLS	regresión parcial de mínimos cuadrados
R	coeficiente de correlación
R²	coeficiente de correlación al cuadrado
PRESS	suma cuadrática de los errores residuales de predicción
RPE	error relativo de predicción
RR	regresión “ridge”
SEC	error estándar de calibración

SEP	error estándar de predicción
SEPT	error estándar de predicción total
SFE	extracción en fluidos supercríticos
S/N	relación señal-ruido
TBA	nitrate de tetrabutylamonio
TCF	2,4,6-triclorofenol
TLC	cromatografía de capa fina
TMA	nitrate de tetrametilamonio
TPA	nitrate de tetrapropilamonio
USEPA	Agencia de protección medioambiental de Estados Unidos (EPA)
UV-VIS	ultravioleta-visible
WLS	regresión de mínimos cuadrados ponderada

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
A. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
A.1. GENERALIDADES SOBRE FENOLES	9
A.1.1. Origen.....	9
A.1.2. Propiedades.....	11
A.1.3. Toxicidad	14
A.1.4. Utilidad	17
A.2. PROPIEDADES Y TOXICIDAD DE LOS FENOLES CLORADOS.....	20
A.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE FENOLES CLORADOS	23
A.3.1. Extracción y Preconcentración.....	23
A.3.2. Métodos espectrofotométricos de UV-VIS.....	28
A.3.3. Métodos cromatográficos.....	33
A.3.3.a. Cromatografía líquida de partición.....	33
A.3.3.b. Cromatografía de gases.....	40
A.3.3.c. Cromatografía de capa fina.....	46
A.3.3.d. Otros métodos cromatográficos.....	47
A.3.4. Métodos electroanalíticos	49
A.3.5. Otros métodos.....	52
A.4. LEGISLACIÓN SOBRE CONTENIDOS MÁXIMOS	54
A.5. LOS PARES IÓNICOS EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	56
A.5.1. Propiedades.....	56

A.5.2. Extracción líquido-líquido	58
A.5.3. Las sales de amonio cuaternario como formadores de pares iónicos y su determinación espectrofotométrica	60
A.6. ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA	63
A.6.1. Fundamento teórico y particularidades	63
A.6.2. Aplicaciones de la espectrofotometría derivada.....	66
A.7. CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE.....	70
A.7.1. Introducción	70
A.7.2. Métodos de calibración multivariante.	74
A.7.2.a. Regresión clásica de mínimos cuadrados (CLS).....	74
A.7.2.b. Regresión inversa de mínimos cuadrados (ILS)	81
A.7.2.c. Filtro de Kalman (KF)	85
A.7.2.d. Regresión de componentes principales (PCR) y regresión parcial de mínimos cuadrados (PLS)	92
A.7.2.e. Otros métodos	100
A.7.3. Parámetros estadísticos en calibración multivariante	106
A.7.4. Diseño experimental en calibración multivariante.....	112
A.7.5. Selección de señales analíticas.....	117
A.7.6. Aplicaciones de la calibración multivariante en FIA	122
B. FINALIDAD Y PLANTEAMIENTO	127
C. PARTE EXPERIMENTAL.....	133
C.1. APARATOS Y MATERIAL.....	135
C.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES	136
C.3. MUESTRAS.....	139
C.4. PROCEDIMIENTOS.....	140
C.4.1. Método manual.....	140

C.4.1.a. Estudio extractivo-espectrofotométrico de los distintos clorofenoles en presencia de sales de amonio cuaternario.....	140
C.4.1.b. Determinación simultánea de clorofenoles aplicando un método directo CLS y espectrofotometría derivada	140
C.4.1.c. Determinación de clorofenoles mediante calibración multivariante CLS y espectrofotometría derivada.....	141
C.4.1.d. Procedimiento de estimación del número mínimo de mezclas de calibración	141
C.4.1.e. Selección de las longitudes de onda para la determinación multivariante de clorofenoles	142
C.4.2. Método automático (FIA).....	143
C.4.2.a. Determinación de clorofenoles mediante calibración multivariante en FIA y espectrofotometría derivada.....	143
C.4.2.b. Determinación multivariante de clorofenoles en aguas.....	145
C.4.2.c. Determinación multivariante de clorofenoles en orina.....	146
D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	149
D.1. MÉTODO MANUAL	151
D.1.1. Estudio extractivo-espectrofotométrico de los clorofenoles en presencia de sales de amonio cuaternario	151
D.1.1.a. Influencia de la naturaleza de la sal de amonio cuaternario y del pH.....	151
D.1.1.a.1. 2-clorofenol.....	152
D.1.1.a.2. 4-cloro-3-metilfenol.....	153
D.1.1.a.3. 2,4-diclorofenol.....	154
D.1.1.a.4. 2,4,6-triclorofenol.....	155
D.1.1.a.5. Pentaclorofenol	158
D.1.1.b. Influencia del disolvente orgánico	160
D.1.1.c. Influencia de la concentración de TBA.....	164
D.1.2. Determinación simultánea de clorofenoles mediante un método directo de regresión lineal clásica de mínimos cuadrados (CLS)	166
D.1.2.a. Normalización de espectros	166

D.1.2.b. Elección del orden de derivada.....	168
D.1.2.c. Selección del intervalo de longitudes de onda.....	171
D.1.2.d. Determinación de clorofenoles en diferentes mezclas.....	172
D.1.3. Determinación simultánea de clorofenoles mediante calibración multivariante CLS y espectrofotometría derivada.....	176
D.1.3.a. Etapa de calibración.....	176
D.1.3.b. Etapa de validación.....	178
D.1.4. Determinación simultánea de clorofenoles mediante diferentes métodos de calibración multivariante. Estudio comparativo de los métodos CLS, ILS, KF, PCR y PLS.....	184
D.1.4.a. Estimación del número mínimo de mezclas de calibración.....	187
D.1.4.b. Selección de las longitudes de onda.....	191
D.2. MÉTODO AUTOMÁTICO (FIA).....	200
D.2.1. Optimización de las variables hidrodinámicas.....	201
D.2.1.a. Volumen de inyección.....	201
D.2.1.b. Caudal de la fase acuosa.....	202
D.2.1.c. Caudal de la fase orgánica.....	204
D.2.1.d. Longitud del reactor y del bucle de extracción.....	205
D.2.1.e. Diámetro interno del reactor y del bucle de extracción.....	206
D.2.2. Optimización de las variables químicas.....	207
D.2.2.a. Influencia del pH.....	208
D.2.2.b. Influencia de la fuerza iónica.....	208
D.2.2.c. Influencia de la concentración de TBA.....	210
D.2.3. Determinación de clorofenoles mediante calibración multivariante en FIA y espectrofotometría derivada.....	213
D.2.3.a. Selección del intervalo de longitudes de onda.....	216
D.2.3.b. Selección del número de factores en PCR y PLS.....	218
D.2.3.c. Detección de mezclas de calibración que se encuentran fuera del intervalo muestral (“outliers”).....	223
D.2.3.d. Etapa de validación.....	235
D.2.4. Determinación multivariante de clorofenoles en diferentes tipos de aguas.....	247

D.2.4.a. Agua purificada (Milli Q).....	248
D.2.4.b. Agua de consumo público.....	253
D.2.4.c. Agua de río	258
D.2.5. Determinación multivariante de clorofenoles en muestras de orina humana	265
D.2.5.a. Tratamiento de hidrólisis.....	266
D.2.5.b. Determinación de clorofenoles en muestras de orina liofilizada	268
D.2.5.c. Determinación de clorofenoles en muestras de orina humana	276
E. CONCLUSIONES.....	279
F. BIBLIOGRAFÍA.....	293

INTRODUCCIÓN

El empleo de fenoles en diversas actividades industriales y agrícolas ha hecho necesario su control debido a su posible toxicidad que incide sobre la salud humana. El gran número de fenoles potencialmente presentes obliga a una selección previa de especies representativas de los fenoles, de forma que su presencia o ausencia suministre información del conjunto. En este sentido, la agencia de protección medioambiental norteamericana (USEPA) ha seleccionado 11 fenoles contaminantes prioritarios en base a su frecuencia de aparición, toxicidad y persistencia, siendo 5 de ellos clorofenoles: 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol.

La importancia que estos fenoles tienen para la salud humana así como su posible presencia en aguas, suelos y alimentos, hacen que habitualmente sean objeto de continuos estudios científicos y que la puesta a punto de nuevos métodos de análisis sea un interesante reto para numerosos químicos analíticos.

En este sentido, la espectrofotometría UV-VIS es la técnica que viene utilizándose para la determinación de fenoles totales, siendo con este fin la

técnica más utilizada hoy día y en la que están basados numerosos métodos oficiales y de referencia para el análisis de fenoles. Su estructura química con un único anillo aromático hace que los fenoles presentan absorción de la radiación en la región del espectro comprendida entre 200 y 360 nm, siendo la absorptividad relativamente baja, por lo que habitualmente se requiere su derivatización, siendo la 4-aminoantipirina (4-AAP) el reactivo habitualmente utilizado para estos fines.

El empleo de reactivos como 4-AAP, o incluso otros como monobromuro de yodo (IBr) o 3-metil-2-benzotiazolinhidrazona (MBTH), si bien mejoran la sensibilidad de la determinación espectrofotométrica, no se puede decir lo mismo en cuanto a la selectividad, por lo que habitualmente la determinación espectrofotométrica de fenoles se hace de forma conjunta, refiriéndose los resultados a cantidades totales de fenol.

Puesto que los fenoles no presentan todos la misma toxicidad, frecuentemente se requiere su determinación individual. A tal fin, se utilizan técnicas cromatográficas. Sin embargo, debido a la polaridad de los fenoles, la determinación mediante cromatografía de gases requiere su derivatización previa, lo que aumenta la complejidad del análisis, mientras que la cromatografía líquida requiere, por lo general, una compleja preparación de la muestra para eliminar la matriz, la cual también tiene características polares.

Una alternativa a los métodos cromatográficos es la determinación espectrofotométrica individual sin separación física previa, utilizando procedimientos matemáticos basados en la calibración multivariante. En principio, mediante el empleo de la calibración multivariante, partiendo de un modelo adecuado, es posible llegar a conocer en que proporción se encuentra cada uno de los componentes de una mezcla sin necesidad de una separación físico-

química previa de cada uno de los componentes, lo que facilita enormemente el proceso de análisis al eliminar aquellos pasos del proceso analítico relacionados con la separación de los analitos de la matriz.

La presente memoria se centra en la determinación extractivo-espectrofotométrica simultánea de los cinco clorofenoles contaminantes prioritarios, 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol, empleando sales de amonio cuaternario, las cuales favorecen la extracción de los clorofenoles. El empleo de la sal de amonio cuaternario nitrato de tetrabutilamonio (TBA) se muestra especialmente ventajosa en la determinación simultánea de estos clorofenoles, pues no solo favorece la extracción, sino que, ajustando adecuadamente el pH, se puede conseguir una mayor diferenciación de los espectros, ya que los clorofenoles más ácidos, como el 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol, se extraen formando pares iónicos con la sal de amonio cuaternario, mientras que los clorofenoles menos ácidos como el 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol y 2,4-diclorofenol lo hacen en forma neutra. Esta mayor diferenciación de los espectros, favorece el posterior cálculo multicomponente de su concentración en la mezcla. La determinación extractivo-espectrofotométrica simultánea se realizó mediante diferentes métodos de calibración multivariante como regresión clásica de mínimos cuadrados (CLS), regresión inversa de mínimos cuadrados (ILS), filtro de Kalman (KF), regresión de componentes principales (PCR) y regresión parcial de mínimos cuadrados (PLS). Se estudia la automatización del método mediante FIA, y se aplica a la determinación de clorofenoles contaminantes prioritarios en muestras de agua; estudiándose también su determinación en matrices muy complejas como en orina humana.

A. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A.1. GENERALIDADES SOBRE FENOLES

A.1.1. Origen

Los fenoles son compuestos aromáticos que se caracterizan por tener uno o varios grupos hidroxilo unidos directamente al anillo aromático y por lo general, se nombran como derivados del miembro más sencillo de la familia, el fenol. Ocasionalmente, los fenoles se denominan hidroxicompuestos mientras que los fenoles con sustituyente monometilados reciben el nombre especial de cresoles.

Puesto que los fenoles y los alcoholes contienen el grupo hidroxilo, ambas familias se asemejan en algún aspecto. Sin embargo, tanto por sus propiedades, como por su preparación, ambos compuestos difieren ampliamente, por lo que suelen ser clasificados como familias diferentes.

La mayoría de los derivados fenólicos se obtienen a partir del fenol, el cual a su vez se sintetiza a partir de benceno. Por el volumen de producción, el fenol ocupa uno de los principales lugares en la lista de compuestos aromáticos sintéticos. Del alquitrán de hulla se obtiene una cierta cantidad de fenol y también de cresoles, siendo las reacciones de síntesis la principal fuente de producción. Los métodos tradicionales de síntesis consisten en la fusión con álcali del bencenosulfonato sódico o la hidrólisis del clorobenceno, ambos métodos están siendo sustituidos por otros nuevos como la descomposición del hidropéroxido de cumeno, dando acetona como subproducto (1).

Los fenoles también se pueden encontrar en la naturaleza como consecuencia de la degradación natural de la materia orgánica. Algunos de ellos como el eugenol, el isoeugenol, el anetol y el timol son los responsables del olor del clavo, nuez moscada, anís y tomillo respectivamente, mientras que el ácido o-hidroxibenzoico (ácido salicílico), del que deriva la aspirina se puede obtener de la corteza del sauce. La presencia de fenoles naturales en agua no suele exceder de un 1 µg/L (2). Niveles más altos indican generalmente la presencia de algún vertido contaminante en el agua.

Diversas son las industrias que pueden originar fenoles como residuos de su actividad, entre las cuales cabe mencionar las refinerías de petróleo, las industrias químicas, las fábricas de pasta de papel, las plantas de tratamiento de la madera y las fábricas de colorantes. También se originan como productos intermedios o finales en los procesos de degradación de otras moléculas (3).

Una fuente importante de clorofenoles contaminantes lo constituyen los procesos de cloración. El Cl_2 como contaminante del medio ambiente es capaz de reaccionar con el fenol y así, una disolución de 20 mg/L que reacciona con otra de 40 mg/L de Cl_2 a pH 8 produce después de 18 horas: 2-clorofenol (<5%), 2,4-diclorofenol (20%), 2,6-diclorofenol (25%) y 2,4,6-triclorofenol

(40-50%) (3). Por otra parte, la formación de uno u otro clorofenol depende del nivel de cloración del agua, prevaleciendo el 2-clorofenol cuando el nivel de cloración es de 0.1 mg/L y el 2,4,6-triclorofenol cuando es de 0.5 mg/L (4). Estos procesos de cloración se producen, principalmente, en la purificación de aguas residuales y en el blanqueo del papel. El Cl_2 es también utilizado para evitar el crecimiento de algas y otros organismos en las aguas de refrigeración de las centrales eléctricas y aunque se encuentran clorofenoles a concentraciones menores de 25 $\mu\text{g/L}$ su importancia radica en el volumen de agua tratada. Todos estos procesos conducen a la liberación de grandes cantidades de clorofenoles al medio ambiente (5-8). La formación de diferentes compuestos clorados en el proceso de cloración del agua ha sido estudiada por diferentes autores (4,9-11). Se ha encontrado que cuando la relación cloro/fenol es de 3:1 se produce la máxima cantidad de clorofenoles, mientras que la preoxidación con permanganato (12) o la oxidación fotocatalítica (13) controla la formación de estos fenoles.

A.1.2. Propiedades

Se han determinado propiedades físico-químicas tales como su solubilidad en agua, el pKa, el coeficiente de reparto n-octanol/agua ($\log K_{ow}$) y su densidad relativa (tabla I). Estos datos han sido la base para aumentar el conocimiento de los factores moleculares que gobiernan su distribución ambiental. Así mismo, estos datos se utilizan para la interpretación de los mecanismos de las reacciones orgánicas y en los estudios de la relación estructura-actividad aplicados a Farmacología y Toxicología.

Los fenoles más sencillos son líquidos o sólidos de bajo punto de fusión, pero con puntos de ebullición bastante elevados debido a su facilidad para

TABLA I. Constantes físico-químicas características de fenoles

Compuesto	P.M.	P.F. (°C)	P.E. (°C)	Densidad Relativa	Índice de Refracción	Solubilidad en agua % (w/w) 25 °C	pKa	log Kow
Fenol	94.11	43	181.7	1.0576 ²⁰	1.5408 ⁴¹	8.7	9.99	1.46
2-metilfenol	108.14	30.9	191	1.0273 ²⁰	1.5361 ²⁰	2.5	10.26	1.95
3-metilfenol	108.14	11.5	202.2	1.0336 ²⁰	1.5438 ²⁰	2.6	10.00	2.00
4-metilfenol	108.14	34.8	201.9	1.0178 ²⁰	1.5312 ²⁰	2.3	10.26	1.93
2,4-dimetilfenol	122.17	27	210	0.9650 ²⁰	1.5420 ¹⁴	0.4	10.58	2.42
2-clorofenol	128.56	9.0	174.9	1.2634 ²⁰	1.5524 ²⁰	2.8	8.48	2.15
3-clorofenol	128.56	33	214	1.2680 ²⁵	1.5565 ⁴⁰	2.6	9.02	2.49
4-clorofenol	128.56	43	219.7	1.2651 ⁴⁰	1.5579 ⁴⁰	2.7	9.37	2.42
2,4-diclorofenol	163.00	45	210	—	—	0.5	7.85	2.08
2,4,6-triclorofenol	197.45	69.5	246	1.4901 ⁷⁵	—	0.1	6.00	3.69
Pentaclorofenol	266.34	174	310 ^{75a} d	1.9780 ²²	—	5x10 ⁻⁴	5.25	5.85
4-cloro-3-metilfenol	142.58	67	235	—	—	0.4	9.72	3.10
2-nitrofenol	139.11	45	216	1.2942 ⁴⁰	1.5723 ⁵⁰	0.2	7.23	1.78
3-nitrofenol	139.11	97	194 ⁷⁰	—	—	1.4	8.40	2.00
4-nitrofenol	139.11	115	279 d,s	1.4790 ²⁰	—	1.6	7.08	1.90
2,4-dinitrofenol	184.11	116	s	1.6830 ²⁴	—	0.6	3.93	1.53
4,6-dinitro-2-metilfenol	198.14	86.5	—	—	—	1x10 ⁻²	4.31	2.12
2,4,6-trinitrofenol	229.11	122	s	—	1.7630	1.4	0.38	1.96

P.M.: Peso molecular. **P.F.:** Punto de fusión. **P.E.:** Punto de ebullición., presiones (en mmHg) como superíndices (s: sublima. d: descompone)
 Densidad relativa e índice de refracción medidos a las temperaturas (en °C) indicadas en los superíndices.

Kow: Coeficiente de partición n-octanol/agua. $Kow = \frac{[fenol]_o}{[fenol]_w}$

formar puentes de hidrógeno. Este enlace de hidrógeno puede ser intermolecular o intramolecular (quelación) y está relacionado con muchas de las propiedades de los compuestos orgánicos. Son en sí incoloros, salvo que presenten algún grupo capaz de imponerles coloración, como por ejemplo el grupo nitro. No obstante, se oxidan con facilidad; por lo que a menudo se les encuentra coloreados, a menos que estén cuidadosamente purificados. La oxidación de los fenoles depende del grado de exposición a la luz y al aire, y de la presencia o ausencia de impurezas metálicas. El curso de la oxidación es complejo influyendo en gran medida su propia estructura aunque la mayoría de ellos dan lugar a derivados de difenilo o a quinonas que son las responsables del color.

La mayor parte de los fenoles son poco solubles en agua y su solubilidad se ve drásticamente disminuida cuando aumenta la fuerza iónica del medio. Así, el fenol cuya solubilidad, a 25°C en disolución salina de NaCl (16 g/L) es de 70 g/L; se reduce a 8.8 g/L cuando la disolución de NaCl es de 312 g/L (14).

En cuanto a sus propiedades químicas los fenoles son compuestos con carácter ligeramente ácido, propiedad que los distingue de los alcoholes. La mayoría de los fenoles son menos ácidos que el agua lo que permite que hidróxidos alcalinos en disolución acuosa reaccionen con ellos formando sales o iones fenóxidos, mientras que los ácidos minerales los transforman de nuevo en fenoles. Los iones fenóxidos son más estables que los propios fenoles debido al efecto neto de la resonancia del anillo aromático. En general, la constante de acidez de los fenoles está comprendida entre 10^{-5} y 10^{-10} , presentando, por tanto, una acidez considerablemente menor que la de los ácidos carboxílicos (K_a alrededor de 10^{-5}).

La presencia de sustituyentes donadores de electrones (activantes) hace disminuir la acidez del fenol al dificultar la deslocalización de la carga en el anillo aromático. Por ello, los metilfenoles tienen los pK_a más elevados, mientras

que la presencia de sustituyentes captadores de electrones (desactivantes) hacen aumentar la acidez del fenol considerablemente, siendo el caso más extremo el 2,4,6-trinitrofenol, normalmente conocido como ácido pícrico. El efecto es más acusado cuando los sustituyentes se encuentran en la posición orto- o para- con respecto al grupo hidroxilo, debido a la conjugación de esas posiciones con dicho grupo. Los sustituyentes afectan decisivamente a la reactividad. Así, la oxidación es más difícil en los clorofenoles por su menor activación, mientras que los sustituyentes desactivantes pueden desactivar el anillo aromático de tal forma que se facilite su sustitución nucleófila.

A.1.3. Toxicidad

Las propiedades del fenol y su toxicidad se conocen desde hace muchos años, de ahí que este compuesto y sus derivados sean utilizados como desinfectantes. El fenol puede ser detectado en agua por su olor y sabor en el intervalo de concentración 0.01-0.1 mg/L (15). El fenol es letal para los peces en concentraciones muy bajas, causando la muerte de la trucha después de tres horas de exposición a concentraciones de 6 mg/L.

Sobre el mecanismo de actuación Van Overbeek (16) señala que ciertos fenoles son agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa, reacción que tiene lugar en las mitocondrias celulares y que produce ATP (adenosín trifosfato), que es de vital importancia para la célula. Esta acción sobre las mitocondrias ha sido utilizado por Argese y col. (17) para estudiar el efecto tóxico de los clorofenoles mediante un bioensayo basado en la inhibición de la velocidad de reducción del NAD^+ la cual es inducida por el ATP dentro de la cadena respiratoria. La toxicidad de los clorofenoles, expresada como concentración de clorofenol que causa un 50% de inhibición en la velocidad de reducción del NAD^+ , varía entre 0.81 mg/L para el pentaclorofenol y 17 mg/L para el 2-clorofenol

indicando la tendencia general de un incremento de la toxicidad cuanto mayor es la sustitución de átomos de cloro en la molécula.

Sobre los efectos que producen los fenoles en distintos organismos hay que destacar la extensa revisión de Buikema y col. (3), en la que se describe detalladamente su incidencia sobre diferentes especies de algas, protozoos, y otros organismos acuáticos. Estos mismos autores incluyen a los fenoles como inhibidores metabólicos específicos; así, señalan que el pentaclorofenol presenta inhibición o activación de enzimas o de sistemas enzimáticos aunque probablemente su acción se ejerza por unión a proteínas mitocondriales. Estos mecanismos afectan a una gran variedad de organismos de distinta forma, por lo cual los fenoles muestran distintos grados de toxicidad. Entre los efectos más comunes de los fenoles destaca la mutagenicidad en los cromosomas, cuya acción está relacionado con la oncogenia. En general se ha encontrado una baja toxicidad oral de los clorofenoles en organismos animales (18) a excepción del pentaclorofenol cuya toxicidad y oncogenicidad se deben a la frecuente contaminación con dioxinas (19) y fenoxifenoles (20), pero cuando se purifica cuidadosamente sólo produce un ligero efecto mutagénico en células de mamífero (21).

Banerjee y col. (22,23) han comprobado que el aumento de la toxicidad de los clorofenoles con el número de sustituyentes de cloro en la molécula se relaciona con la difícil biodegradación de estos compuestos, atribuyendo a sus propiedades lipofílicas la difícil degradación de las mismas. No obstante, Kishino y Kobayashi (24), demuestran que dicha toxicidad y acumulación de los clorofenoles depende del pH del medio. Así, a pH inferiores al pKa del clorofenol su toxicidad y acumulación, en peces, permanece prácticamente constante, mientras que a pH superiores al pKa disminuye drásticamente. Igualmente, dichos autores concluyen que la transferencia de los clorofenoles del medio acuático a los peces se realiza principalmente por difusión pasiva de la forma no disociada a través de las membranas.

Para Schultz y Riggin (25) existe una gran correlación entre la toxicidad de los alquifenoles y fenoles halogenados, con el coeficiente de partición n-octanol/agua, que es una medida de lipofilia, concluyendo que los fenoles con sustituyentes dadores de electrones, como los grupos alquilo, son algo menos tóxicos que aquellos con sustituyentes aceptores de electrones, como son los grupos halógenos.

Otro de los factores que contribuyen de forma importante a la toxicidad de los fenoles es la bioacumulación debido a su carácter lipofílico (26) por lo que se deduce que el pentaclorofenol al ser el más lipófilo es el más bioacumulable. Por otra parte, Jansson y Jansson (27) sugieren la existencia de una relación entre la toxicidad de los clorofenoles y su permeabilidad en las membranas celulares. Varios autores (28-31) detectan altas concentraciones de clorofenoles en trabajadores expuestos a los mismos, así como en personas que viven en casas de madera que han sido tratadas con pentaclorofenol, llegando a la conclusión de que los clorofenoles se absorben principalmente a través de la piel mediante contacto directo, pudiendo ser la concentración de diez a cien veces superior con respecto a la absorción mediante la vía respiratoria. En algunos casos se han detectado niveles significativos de pentaclorofenol incluso siete años después de que la madera fuera tratada lo que indica una exposición continuada a dicho compuesto.

Finalmente, hay que destacar la importancia que para la salud humana tiene la presencia de clorofenoles en aguas de consumo humano. Estos compuestos producidos por la acción del Cl_2 sobre la materia orgánica presente en disolución, afectan tanto al sabor como al olor del agua a concentraciones inferiores a 1 $\mu\text{g/L}$ (32) por lo que debido a su toxicidad ha aumentado la necesidad de controlar sus concentraciones y, así, diferentes países han fijado unos límites para la concentración de fenoles en agua dependiendo del uso de la

misma. En muchos países la concentración de fenoles totales en aguas de consumo esta limitada a cantidades entre 0.5 y 1 $\mu\text{g/L}$ debido a la toxicidad y mal sabor que producen sus derivados clorados (33,34). Este valor excluye los fenoles naturales que no reaccionan con el cloro.

A.1.4. Utilidad

Los fenoles son productos de gran interés industrial debido a la diversidad de sus aplicaciones. El fenol y sus derivados más simples, se utilizan principalmente para la fabricación de polímeros sintéticos y plásticos entre los que se encuentran la baquelita y polímeros similares. El proceso que tiene lugar es una polimerización por etapas entre el fenol y el formaldehído obteniéndose como producto final una estructura rígida o polímero de red espacial. Estas resinas se emplean como barnices, colas, adhesivos y en ocasiones como intercambiadoras de cationes.

Algunos fenoles se utilizan como plaguicidas por su acción herbicida, bactericida, fungicida e insecticida, lo que favorece su difusión medioambiental a través de las actividades agrícolas (35) y su entrada en la cadena alimenticia. Los nitrofenoles tienen una marcada acción insecticida, que es mayor en los alquil o cicloalquilderivados de los dinitrofenoles, siendo el más conocido de este grupo el 4,6-dinitro-2-metilfenol (DNOC). Son insecticidas efectivos por contacto o por ingestión, utilizándose sus sales como herbicidas de contacto selectivo y en tratamientos de postemergencia en cosechas tolerantes. Su fitotoxicidad es grande y limita sus uso a tratamientos invernales de los arboles en letargo. En cambio, los ésteres de los nitrofenoles, cuando el grupo acilo tiene cuatro o más carbonos, son poco fitotóxicos, y algunos se utilizan como fungicidas y acaricidas. El 4-nitrofenol se utiliza como fungicida del corcho.

Los clorofenoles son fungicidas y bactericidas muy activos, pero muy fitotóxicos para utilizarlos en la agricultura, y solo son útiles para aplicaciones especiales como en la conservación de la madera. El 2,4,5-triclorofenol se utiliza mucho para la desinfección de semillas. También se utilizan en la fabricación de herbicidas fenóxidos como el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y el 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético). En dicha fabricación parte de los clorofenoles pueden transformarse en clorodibenzo-p-dioxinas (dioxinas) al reaccionar dos iones clorofenóxidos por efecto de la temperatura.

La aplicación de ciertos fenoles para la obtención de medicamentos es bien conocida, así, el ácido 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico) es el precursor de la aspirina y el 2-dihidroxibenceno (pirocatequina) se emplea en la fabricación del guayacol y de la adrenalina.

Igualmente los fenoles son productos de partida de ciertos éteres que se emplean en perfumería como el anisol, el fenetol y el éter difenílico, los cuales se obtienen mediante síntesis de Williamson. Otros se usan para la obtención de sabores como la vainillina y el anetol que son de origen natural o los éteres alifáticos del 2-amino-4-nitrofenol que poseen un gran poder edulcorante.

Otros fenoles, como el ácido pícrico y el diazonitrofenol, presentan propiedades detonantes siendo de utilidad en ciertos explosivos. La hidroquinona (1,4-dihidroxibenceno), el pirogallol (1,2,3-trihidroxibenceno), el 4-aminofenol y sus derivados se emplean en fotografía como reveladores por oxidarse muy fácilmente.

La obtención de colorantes es una de las aplicaciones más importantes de los fenoles. Estos colorantes suelen ser de tipo azoico y se obtienen por copulación de las sales de diazonio con los fenoles. Entre ellos se encuentran la crisamina y el amarillo de alizarina R, obtenidos mediante la copulación del

ácido salicílico con la diazobencidina y 4-nitroanilina diazotada respectivamente. Otro tipo de colorantes se preparan mediante condensación de los fenoles con anhídridos de ácidos aromáticos polibásicos.

Los cresoles butilados son antioxidantes del caucho y estabilizadores para grasas no comestibles y aceites aislantes mientras que el 2,4,6-triclorofenol se usa en la fabricación de agentes de control de lodos en las torres de enfriamiento y en la fabricación de papel. Los fenoles se utilizan, en general, en numerosas síntesis orgánicas así como en la fabricación de ciertas drogas.

A.2. PROPIEDADES Y TOXICIDAD DE LOS FENOLES CLORADOS

Los clorofenoles son compuestos sólidos cristalinos e incoloros a excepción de los monoclorofenoles que son líquidos volátiles. Esta volatilidad hace que se dispersen a través de la atmósfera y se detecten olfativamente. Los más conocidos contienen uno, dos, tres o cinco átomos de cloro en su molécula y un único grupo hidroxilo, y se utilizan principalmente como antisépticos e intermediarios químicos en síntesis químicas y en la producción de insecticidas, herbicidas y fungicidas, destacando entre todos ellos el pentaclorofenol el cual se utiliza como conservante de la madera (36-38).

Los clorofenoles son más ácidos que el fenol. Este aumento de acidez se debe a que el átomo de cloro se comporta como aceptor de electrones debido a su electronegatividad (efecto -I) reforzando la acidez del fenol, que a su vez se ve incrementada al aumentar el número de átomos de cloro en el anillo aromático, especialmente en las posiciones orto- y para- con respecto al grupo hidroxilo.

Se descomponen en presencia de oxidantes tales como el H_2O_2 y $NaClO$ en combinación con la radiación ultravioleta, mientras que el oxígeno disuelto apenas tiene efecto en su descomposición (39). Por otra parte, los policlorofenoles se biodegradan a través de microorganismos anaerobios a monoclorofenoles mediante procesos de decloración reductiva (40). La velocidad de biodegradación disminuye a medida que aumenta el nivel de cloración del fenol, variando la constante de velocidad de biodegradación para el caso del pentaclorofenol entre 0.021 y 0.058 l/g.h (41). Un paso más en la biodegradación de estos fenoles es el dado por Armenante y col. (42) que estudian un sistema integrado anaeróbico-aeróbico para la biodegradación total de los clorofenoles, es decir, no solo la decloración anaeróbica sino también la mineralización aeróbica de

los productos obtenidos (43). Otro proceso de deshalogenación de los clorofenoles es mediante una reacción de acoplamiento oxidativo con radicales libres en presencia de determinadas enzimas (44). En este caso la decloración depende del tiempo de reacción, pH y cantidad de enzima utilizada.

Por otra parte, Bunce y Nakai (45) estudian la fotodegradación de los clorofenoles en la atmósfera así como la reacción de estos con el radical hidroxilo, presente en la atmósfera debido a la fotodisociación del ozono. Igualmente, estos autores concluyen que la dispersión medioambiental debido al transporte atmosférico de los clorofenoles debería ser menos importante con respecto a otros contaminantes (tales como los policlorobifenilos) puesto que, a pesar de ser más volátiles, son más solubles en agua y por lo tanto sufren procesos de deposición debido a la lluvia. El tiempo de residencia de los clorofenoles en la atmósfera depende de la estación del año, siendo del orden de uno o dos días en el verano. Por otra parte, la fotodegradación de los clorofenoles mediante la utilización conjunta de radiación ultravioleta y ozono, ha sido utilizada para la destrucción de más del 90% de los clorofenoles en la purificación del agua (46).

Aquellos fenoles que poseen el átomo de cloro en posición orto- con respecto al grupo hidroxilo, dan lugar a una estructura cíclica (quelación) mediante enlace de hidrógeno intramolecular, modificando notablemente sus propiedades físicas, así como su comportamiento químico con respecto a sus isómeros; presentan menor temperatura de ebullición y fusión, son más volátiles y más solubles en disolventes apolares. Igualmente, debido a la existencia de dicho enlace, los 2-clorofenoles son esencialmente monómeros en disolución acuosa, mientras que los isómeros meta- y para- presentan asociación con otras moléculas y con el agua, al formar enlace de hidrógeno de tipo intermolecular.

Finalmente, cabe destacar la gran toxicidad de los clorofenoles, cinco de los cuales (2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol) fueron incluidos entre los fenoles contaminantes prioritarios por la USEPA (47). A partir de sus efectos mitocondriales y en el desarrollo embrionario y fetal y de sus diferentes parámetros físico-químicos tales como el coeficiente de partición n-octanol/agua, la constante de disociación y sus conectividades moleculares, varios autores han evaluado su relación estructura-actividad, toxicidad y capacidad de adsorción (17,48-50). A partir de estos datos se ha establecido que, en general, la toxicidad de estos compuestos es mayor cuanto mayor es el número de átomos de cloro unidos al anillo aromático, es decir, pentaclorofenol > tetraclorofenoles > triclorofenoles > diclorofenoles > monoclorofenoles > fenol, siendo los isómeros con sustitución en posición meta- con respecto al grupo hidroxilo los más tóxicos y que su acción tóxica presenta dos modos diferentes denominados narcosis polar y narcosis no específica. Concretamente, el pentaclorofenol presenta efectos tóxicos significantes a niveles de 117 mg/Kg para el ratón (51) de 0.05 a 0.43 mg/Kg para las algas (52) y de 961 mg/Kg para las aves (53). En el caso del hombre, los clorofenoles pueden producir diferentes enfermedades gastrointestinales (54) pudiendo tener efectos en el metabolismo de las porfirinas, presentando, igualmente, efectos cancerígenos, propiedades inmunosupresoras y desactivación de ciertas enzimas debido a su decloración gradual en los tejidos dando lugar a los correspondientes peróxidos.

Finalmente, cabe destacar la revisión bibliográfica llevada a cabo por Ahlborg y Thunberg sobre la presencia, toxicidad, metabolismo e impacto medioambiental de los clorofenoles (55).

A.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE FENOLES CLORADOS

Con relación a la determinación de fenoles y clorofenoles, Dougherty (56) realiza una revisión bibliográfica sobre los diferentes métodos de análisis así como la preparación, estabilidad, almacenamiento y “clean-up” de las muestras. Por otro lado, Crompton (57) hace una revisión de los distintos métodos analíticos: espectrofotometría, LC, GC, TLC y espectroscopía Raman, extendiéndose en los métodos de conservación de la muestra para el análisis de fenoles y dedicando un apartado a los métodos de análisis de clorofenoles con estas técnicas. Otras revisiones en cuanto a la aplicación de métodos cromatográficos (GC y LC) y espectrofotométricas para la determinación de fenoles han sido llevadas a cabo por otros autores (58,59).

Seguidamente se revisan los aspectos más importantes en lo referente a la extracción y preconcentración de fenoles en general, y clorofenoles en particular, así como los métodos habituales de determinación.

A.3.1. Extracción y Preconcentración

Debido a su toxicidad es importante su identificación y determinación a bajas concentraciones, para lo cual es necesario utilizar diferentes métodos de extracción y preconcentración. Dentro de estos métodos destacan la extracción líquido-líquido, la extracción sólido-líquido, la extracción supercrítica y la destilación.

La extracción de fenoles mediante utilización de diferentes disolventes orgánicos ha sido estudiada por varios autores. Dentro de estos disolventes orgánicos están el diclorometano (60-62), el cloroformo (63), el acetato de etilo

(64,65), alcanos (66,67), benceno (68), terc-butilmetileter (69), éter de petróleo (70), etc. La utilización de un sistema en continuo para llevar a cabo dos extracciones simultáneamente primero en medio ácido y posteriormente en medio básico junto con un disolvente orgánico, ha sido estudiado para la determinación de diferentes fenoles mediante análisis multicomponente (71). Cabe destacar los estudios realizados por Korenman y col. (72-77) sobre la extracción de clorofenoles utilizando diferentes disolventes tales como cetonas, ésteres neutros, alquilacetatos, N-metilpirrolidona, etc. Existen, no obstante, una serie de limitaciones en la extracción líquido-líquido. Así, debido al grupo hidroxilo, los fenoles pueden formar enlaces de hidrógeno con la fase acuosa lo que dificulta su extracción. Por otra parte, la utilización de estabilizantes y preservantes en los disolventes orgánicos puede ser una fuente de interferencias. De esta forma, se han identificado, diferentes compuestos que se han formado durante la extracción líquido-líquido aplicando el método EPA 625, debido a la presencia de ciclohexeno en el diclorometano utilizado en la extracción, el cual da lugar a procesos de halogenación y autooxidación (78). Otros problemas asociados a la extracción líquido-líquido es la formación de emulsiones, la posible dificultad de observar la separación entre ambas fases y la extracción de grandes volúmenes de muestra. Esta última dificultad se está solventando mediante la utilización de extracciones en continuo.

Actualmente, hay una gran tendencia a reducir el volumen de disolvente orgánico de manera que reduzca el tiempo de extracción, la contribución de los interferentes y los costes. De esta forma se han desarrollado métodos de microextracción. Un ejemplo de estos métodos es la utilización de 2 ml de metil-terc-butiléter con 30 ml de agua para la extracción de clorofenoles (79).

La preconcentración sólido-líquido se basa en la adsorción de los analitos en un soporte sólido, los cuales son posteriormente eluidos mediante un disolvente orgánico o desorción térmica. Los analitos son retenidos en el soporte

sólido gracias a los enlaces que forman con este y que suelen ser de tipo Van der Waals, enlace de hidrógeno e interacciones electrostáticas siendo, por tanto, el proceso de adsorción/desorción completamente reversible con la consiguiente posibilidad de utilizar el soporte sólido cuantas veces se quiera y en diferentes muestras. Se puede decir que es el método que más ha evolucionado durante los últimos años como método preparativo para la determinación de fenoles, siendo recomendado en diferentes métodos EPA. Entre sus características se encuentran la rapidez, fácil manejo, mayor eficacia en la extracción, menor consumo de disolventes, eliminación de emulsiones, reducción en el manejo de la muestra y posibilidad de automatización, lo que mejora la reproducibilidad de los resultados. Además existen una gran variedad de soportes sólidos que permiten la retención selectiva de unos determinados analitos o interferencias.

Existe una gran variedad de soportes sólidos para la preconcentración de fenoles entre los cuales cabe destacar fases de C_8 , C_{18} y fenilo enlazados químicamente a una matriz de sílice (80-83), resinas copoliméricas de estireno-divinilbenceno ya sean del tipo Amberlita XAD (84-88), PRP-1 (89), PLRP-S (90), cetoderivadas (91) o con grupos de amonio cuaternario (92), copolímero de 1,4-di(metacriloimetil)naftaleno-divinilbenceno (84), Chromosorb-102 (93), gel lipofílico (Lipidex 5000) (94), 8-quinoleína inmovilizada en vidrio de poro controlado (95), espuma de poliuretano (96,97), adsorbentes de tipo carbono grafitizado (98-101), Tenax (96,101), Porapak-N (102) y resinas de intercambio iónico (103-106).

Malaiyandi y col. (107,108) hacen un estudio comparativo sobre la capacidad de preconcentración de diferentes resinas de tipo XAD y resinas de carbono grafitizado del tipo XE sobre varios analitos. En el caso de compuestos orgánicos polares como los fenoles, la preconcentración es más eficaz en las resinas de tipo XAD que en las de tipo XE siendo el pH de la muestra y la polaridad

del eluyente los principales factores que afectan a la capacidad de adsorción/desorción de las resinas. Pocurull y col. (109,110) comparan, igualmente, tres adsorbentes (C_{18} , ciclohexil y poliestirenodivinilbenceno) para la preconcentración de fenoles, observando que la presencia de un reactivo formador de pares iónicos mejora la recuperación de estos en los diferentes adsorbentes obteniendo los mejores resultados para el poliestireno (PLRP-S). Por otra parte, Puig y Barceló (111) comparan otros tantos adsorbentes de diferente polaridad (C_{18} , C_8 , C_2 , ciano, fenil, ciclohexil y poliestirenodivinilbenceno) concluyendo, al igual que Pocurull y col., que aquellos adsorbentes de menor polaridad como son C_{18} y C_8 dan buenos resultados para los fenoles menos polares pero no así para los fenoles más polares mientras que los adsorbentes más polares (C_2 , ciano y fenil) dan lugar a los peores resultados con volúmenes de ruptura menores de 10 ml para todos los fenoles. Los adsorbentes ciclohexil y poliestireno (PLRP-S) dan, en general, los mejores resultados para todos los fenoles estudiados siendo los volúmenes de ruptura superiores para el poliestireno debido a interacciones del tipo π - π , sobre todo para aquellos fenoles que poseen una gran resonancia electrónica (nitrofenoles) o poseen sustituyentes aceptores de electrones (clorofenoles), además de interacciones hidrofóbicas con el adsorbente.

Los factores de capacidad teóricos determinados mediante el método del equilibrio han sido utilizados para predecir la recuperación de los fenoles mediante extracción sólido-líquido en un cartucho de C_{18} (112). En este sentido las recuperaciones predichas y las experimentales coinciden cuando se utilizan disoluciones patrón, mientras que estas últimas disminuyen cuando se utilizan muestras reales, debido a la presencia de interferentes que quedan retenidos en el cartucho, lo que hace disminuir el volumen de fase estacionaria libre. A partir del conocimiento de estos factores de capacidad es posible calcular la concentración mínima de fenol que puede cuantificarse mediante dicha preconcentración.

La extracción supercrítica (SFE) es considerada como un método alternativo tanto para la extracción directa de los fenoles de las muestras así como para la elución de los fenoles preconcentrados en un adsorbente (113-115). Este método presenta una clara ventaja en el caso de matrices complejas, como puede ser tejidos biológicos obteniendo, igualmente, resultados comparables a la extracción Soxhlet, no requiriendo ningún disolvente en la fase de extracción y en un tiempo muy inferior (~35 min.). No obstante, existen varios factores limitantes para su aplicabilidad como pueden ser el coste del instrumento así como las impurezas existentes en los fluidos supercríticos habitualmente utilizados, como el CO₂ y N₂O. Hawthorne y Miller (116) llevan a cabo un estudio comparativo de la SFE (30 min.) y de la extracción Soxhlet (18 horas) de clorofenoles en diferentes muestras medioambientales observando que a la temperatura de 200°C la SFE da resultados similares a la extracción Soxhlet. Por otra parte, la eficacia de extracción del SFE es menor cuando se trabaja a temperaturas de 50°C y no presenta ninguna mejora cuando se incrementa la temperatura hasta los 350°C.

Al igual que en la extracción líquido-líquido también se puede aplicar la microextracción en la extracción sólido-líquido, la cual tampoco requiere el uso de disolventes, y se basa en la extracción de los fenoles en un soporte cubierto de fibra de poliacrilato la cual se introduce posteriormente en el cromatógrafo de gases y los fenoles son desorbidos térmicamente (117).

También se han utilizado para la extracción y preconcentración de fenoles diferentes tipos de membranas (silicona, sulfonamida o modificadas con resinas poliméricas) tanto en análisis por inyección en flujo (FIA) como en cromatografía (118-121), así como la destilación (122,123) y la partición centrífuga (124). La combinación de la SFE y la preconcentración en diferentes tipos de

membrana ha sido estudiada por Tang y Ho (125) obteniendo resultados cuantitativos en la extracción de los derivados acetilados en todos los casos.

En general, mediante la utilización de estos métodos es posible la preconcentración de los fenoles desde niveles de $\mu\text{g/L}$ e incluso desde niveles de ng/L siendo utilizadas, igualmente, para separar las posibles interferencias en su determinación.

A.3.2. Métodos espectrofotométricos de UV-VIS

En general, mediante espectrofotometría se suele determinar la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en la muestra sin hacer distinción entre los diferentes tipos de fenoles. Así, Mohler y Jacob (126) hacen un estudio de cinco métodos espectrofotométricos para la determinación de bajas concentraciones de fenoles en aguas potables y residuales, teniendo en cuenta la sensibilidad, precisión, exactitud, interferencias, reactivos y tiempo requerido para el análisis. De los cinco métodos (Gibbs, nitrosufenol, 4-aminoantipirina, ultravioleta e infrarrojo) el de la 4-aminoantipirina (4-AAP) es el más rápido, preciso y exacto. Sin embargo, todos estos métodos, excepto los que utilizan la absorción que presentan estos compuestos en el zona ultravioleta e infrarrojo, son insensibles a aquellos fenoles sustituidos en la posición para- del anillo aromático, por tener impedida la posición más activada tanto para las reacciones de copulación como para las de condensación y, por otra parte, los fenoles muy desactivados tampoco presentan este tipo de reacciones. Todos estos factores conducen a unos errores por defecto en la determinación de fenoles totales.

Los métodos espectrofotométricos en la zona del ultravioleta se basan generalmente en el desplazamiento batocrómico que sufre el máximo de absorción de los fenoles en disolución alcalina (127), lo que permite la eliminación

de muchas interferencias. No obstante, se han propuesto métodos para la determinación de fenoles en medio ácido con resultados comparables a los obtenidos con la 4-AAP (128). Estos métodos trabajan a nivel de mg/L con posibilidad de bajar al de $\mu\text{g/L}$ (129,130); sin embargo, la determinación de fenoles al nivel de $\mu\text{g/L}$ por espectrofotometría UV directa es difícil debido a su baja absortividad molar.

La determinación de pentaclorofenol en muestras de madera y cuero en el intervalo de concentración 1- 40 mg/L ha sido llevada a cabo con recuperaciones superiores al 98% mediante extracción sólido-líquido en una columna de cianopropil y la utilización de la segunda derivada del espectro UV (131); mientras que la extracción líquido-líquido de triclorofenoles con óxidos orgánicos ha permitido su determinación con recuperaciones superiores al 96% (73). La aplicación de la espectrofotometría derivada junto con la extracción sólido-líquido ha sido también utilizada por Baranowska y Pieszko (132) para la determinación de diferentes clorofenoles en muestras acuosas (10-15 ml) que contenían entre 20 y 200 μg de los mismos.

La reacción con 4-aminoantipirina (4-AAP) fue utilizada por primera vez en los años cuarenta y es la base de muchos métodos que se emplean actualmente (88,133-135). Norwitz y col. (136,137) han estudiado la influencia de SO_3^{2-} y NaCl en esta reacción, mientras que, por otra parte, se han propuesto diferentes modificaciones de este método tales como la utilización de diferentes agentes oxidantes (138), la reducción del volumen de muestra requerido (139) o su automatización (119,127,140,141).

Gales (142) consigue determinar fenoles a concentraciones menores que 1 $\mu\text{g/L}$ con el reactivo 3-metil-2-benzotiazolinhidrazona (MBTH) en presencia de un oxidante. Esteve Romero y col. (143) llevan a cabo la determinación de fenoles mediante su diazotación con 2,4,6-trimetilanilina en medio micelar

obteniendo un límite de detección en el rango 0.2-0.4 mM. Otros reactivos utilizados son: 3,3-dietil-1-(2-fluorenil)triaceno (144), $\text{CoCl}_2\text{-NaNO}_2$ (145), ácido sulfanílico (146), 4-nitroanilina (146), m-fenilendiamina con NaIO_4 (147), 1,10-fenantrolina con Fe(III) (148), o-toluidina (149), bencidina (150), violeta de cristal (151) y las sales de amonio cuaternario (152-155). No obstante, dependiendo del tipo de sustituyente del fenol o de las condiciones experimentales, algunos de ellos pueden no reaccionar con determinados reactivos.

La facilidad de oxidación de los fenoles es igualmente aprovechada para su determinación mediante la oxidación con NaIO_4 dando lugar a las correspondientes quinonas de color amarillo, naranja o rojo (156) o mediante la reducción de la ferritina a ferroina (148).

En cuanto a la determinación de fenoles individuales esta ha sido posible gracias a la aplicación de métodos de análisis multicomponente como la regresión lineal múltiple de mínimos cuadrados (152-154,157) y el filtro de Kalman (158,159) utilizando tanto los espectros (normales, primera y segunda derivada) como curvas cinéticas. En este sentido cabe destacar la comparación de cinco métodos de calibración multivariante llevada a cabo por Navarro Villoslada y col. (160) para la determinación de cuatro clorofenoles. Mediante la utilización de una variante del método de las adiciones estándar (HPSAM), Verdú Andrés y col. (161) determinan un fenol en presencia de otros dos en mezclas ternarias considerando estos dos últimos como interferentes y obteniendo resultados comparables a los obtenidos utilizando una regresión lineal múltiple. Igualmente se ha utilizado la regresión parcial de mínimos cuadrados, así como dos métodos de corrección del fondo, para el análisis de grupos de fenoles con similares características espectrales en aguas residuales (162).

Cabe destacar la aplicación de sistemas en continuo para la determinación de fenoles ya sean totales o individuales. Dentro de la determinación de

fenoles totales, tenemos el método automático de Afghan y col. (127) de la 4-AAP en el que incluyen una extracción líquido-líquido del colorante una vez formado, obteniendo un límite de detección de 5 $\mu\text{g/L}$. Un sistema similar al anterior es el propuesto por Zhi y col. (88) con la diferencia de que en este caso tiene lugar una preconcentración en línea sólido-líquido sobre una columna de XAD-4, obteniendo un límite de detección de 0.2 $\mu\text{g/L}$. Otro sistema en continuo es el establecido por Moreno-Román y col. (95) para la determinación de pentaclorofenol, el cual es previamente preconcentrado en una columna rellena de 8-quinolinol inmovilizado en vidrio de poro controlado. El límite de detección obtenido fue de 2.5 μg siendo el factor de preconcentración de 250 veces. También la utilización de un sistema en continuo de extracción líquido-líquido ha permitido la determinación individual de fenoles utilizando las curvas de extracción obtenidas a lo largo del tiempo de cada uno de ellos y aplicando una regresión de mínimos cuadrados (71).

En cuanto a los sistemas FIA, Sweileh y col. (163) llevan a cabo la determinación total de fenol mediante la reacción de Berthelot utilizando NaClO y NH_3 para formar el correspondiente azul de indofenol. Rodríguez Alcalá y col. (141) automatizan el método de la 4-AAP para la determinación de pentaclorofenol utilizando tanto un método de flujo continuo como de flujo parado obteniendo con este último una mayor selectividad y unos límites de detección entre 0.15 y 0.21 mg/L . Por otra parte, Frenzel y col. (140) llevan a cabo un estudio comparativo de dos reactivos (4-AAP y MBTH) para la determinación total de fenoles a través de un sistema FIA. Los límites de detección obtenidos fueron de 30 $\mu\text{g/L}$ para la 4-AAP y de 12 $\mu\text{g/L}$ para la MBTH siendo este último, a parte de más sensible, más general en cuanto a su reactividad al poder reaccionar con aquellos fenoles con sustituyentes en posición para-. La velocidad de muestreo del sistema FIA fue de 60 muestras/h. Un problema que presenta el reactivo MBTH es que los fenoles presentan su

máximo de absorción en un amplio intervalo de longitudes de onda por lo que es difícil seleccionar una longitud de onda adecuada para su determinación total, cosa que no sucede con la 4-AAP a pesar de su limitación en cuanto a la reactividad. Estos mismos autores estudian la incorporación al sistema FIA de una preconcentración en línea, mediante extracción líquido-líquido o sólido-líquido, del producto formado entre los fenoles y la 4-AAP, obteniendo unos límites de detección de 8 µg/L para el primer caso y de 11 µg/L para el segundo caso (164).

La preconcentración en línea de fenoles y su posterior determinación mediante un sistema FIA basado en la reacción con la 4-AAP ha sido igualmente estudiado por otros autores. Así, Rodríguez Gonzalo y col. (119) utilizan una membrana de silicona para la extracción y preconcentración de los fenoles obteniendo unos límites de detección entre 0.7 y 5.7 µg/L dependiendo de la cantidad de muestra preconcentrada; mientras que Kwade y col. (165) incorporan un aparato de destilación para la eliminación de interferencias y combinando la técnica FIA y el análisis de flujo segmentado (SFA) obtienen un límite de determinación de 0.01 mg/L. A partir de este último trabajo de Kwade y col. se está desarrollando actualmente una norma internacional para la determinación total de fenoles o índice fenólico en agua aplicando el análisis de flujo (166).

Al igual que en los métodos manuales, la aplicación del análisis multi-componente a diferentes sistemas FIA permite la determinación individual de fenoles. Un método utilizado para la determinación de isómeros fenólicos consiste en la monitorización a determinadas longitudes de onda del diagrama de cada muestra inyectada, utilizando tantas longitudes de onda como componentes haya en la mezcla para su determinación (167). Otro método es la obtención de la curva de calibrado para cada componente a la longitud de onda a la cual los otros componentes presentes en la mezcla no absorban (155). Este método es conocido como "zero-crossing".

Un estudio comparativo de tres métodos de análisis multicomponente (regresión de mínimos cuadrados clásico, filtro de Kalman y regresión parcial de mínimos cuadrados) ha sido llevado a cabo por Navarro Villoslada y col. (86) para la determinación de cinco clorofenoles contaminantes prioritarios en agua de grifo mediante un sistema FLA con extracción líquido-líquido. Los clorofenoles, previamente preconcentrados en una resina XAD-4, son determinados a niveles de $\mu\text{g/L}$ utilizando el espectro en primera derivada.

Por último, en la tabla II se resumen las características de algunos de estos métodos para la determinación de fenoles clorados.

A.3.3. Métodos cromatográficos

A.3.3.a. Cromatografía líquida de partición

La cromatografía líquida (LC) es una técnica muy adecuada para el análisis de compuestos fenólicos. La polaridad de los fenoles y su baja presión de vapor que complican su análisis por cromatografía de gases, no tienen un efecto adverso en LC. Esta técnica puede ser utilizada, sin previo tratamiento, para el análisis directo de mezclas complejas de fenoles con alto peso molecular y fenoles polihidroxilados. Esta ventaja se utiliza principalmente en el análisis de fenoles en agua y en el estudio del metabolismo en sistemas biológicos.

En la tabla III se exponen los parámetros más característicos de los métodos para el análisis de clorofenoles y fenoles contaminantes prioritarios (FCP) por LC de partición.

La mayor parte de los autores utilizan sistemas de LC de fase reversa (80,100,105,169) y unos pocos de fase normal (170-172). Debido al carácter

TABLA II. Análisis de clorofenoles por espectrofotometría UV-VIS.

CLOROFENOL	REACTIVO	λ (nm)	LINEALIDAD	MUESTRA	OBSERVACIONES	REFERENCIA
Clorofenoles	Tetrabutylamonio	200-430	0-200 $\mu\text{g/L}$	Aguas	FIA Calibración multivariante	86
Pentaclorofenol	—	302	0.04-0.25 $\mu\text{g/L}$	—	L.D.: 2.5 μg Precon.: 8-quinolinol	95
Clorofenoles	4-AAP	460	1-10 $\mu\text{g/L}$	Aguas naturales	L.D.: 0.5 $\mu\text{g/L}$ Método automático	127
Clorofenoles	NaOH	310	10-100 $\mu\text{g/L}$	Aguas naturales	L.D.: 5 $\mu\text{g/L}$	127
Pentaclorofenol	—	297-304	1-40 mg/L	Madera y cuero	Espectrofotometría derivada	131
Pentaclorofenol	4-AAP	637	1-60 mg/L	Fungicida	L.D.: 0.15 mg/L. FIA	141
Clorofenoles	$\text{NaNO}_2/\text{CoCl}_2$	575-600	1-100 mg/L	Agua potable	L.D.: 0.08-8 mg/L	145
Pentaclorofenol	violeta de cristal	585	0.02-0.16 mg/L	Sangre, Orina	Extracción en cloroformo	151
Clorofenoles	Tetrabutylamonio	250-380	2-20 mg/L	—	Análisis multicomponente	154
2-clorofenol 3-clorofenol	NN-dietil-p-fenilendiamina	660	1.25-25 μM	—	L.D.: 0.25-0.45 μM Filtro de Kalman	158
Clorofenoles	$\text{IBr}/\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	223	2-50 μg	Aguas residuales	Diazotación	168

L.D.: límite de detección. FIA: Análisis por inyección de flujo.

λ : longitud de onda en donde se realiza el análisis.

4-AAP: 4-aminoantipirina.

ácido de los fenoles se emplean disoluciones reguladoras para disminuir el ensanchamiento y la variabilidad de los picos cromatográficos en la mayoría de las separaciones (105,173,174). En algunas ocasiones también se emplean altas concentraciones salinas con el mismo fin (175,176).

La fase estacionaria más comúnmente utilizada por la mayoría de los autores para la determinación de fenoles es la C_{18} (80,100,105,177), la cual puede ser modificada mediante la adición de diferentes sales de amonio cuaternario para mejorar la retención de los mismos (178). Otras fases estacionarias también utilizadas son la C_8 (91,174), la 8-quinoleína-Fe(III) (179), las resinas XAD (180,181), carbón grafitizado poroso (182), fase ligada de difenil (62), ciclodextrinas (183) y columnas de intercambio iónico (85), predominando en todas ellas la separación debida a equilibrios de partición, al estar los fenoles en su forma ácida no ionizada.

En cuanto a los detectores, el más usado es el detector UV (86,105,178,182); sin embargo, también se ha descrito el empleo de otros detectores como los fluorimétricos (173), electroquímicos (91,174,184), de espectrometría de masas (172,185,186), de captura electrónica (171,187), quimioluminiscentes (188,189), infrarrojo (190) y de espectrofotometría de diodos integrados ("diode array") (63,100,110). En ocasiones se emplean simultáneamente dos detectores, como el de UV y el electroquímico (90).

La preconcentración de las muestras es un paso previo necesario cuando se desea disminuir los límites de detección a niveles de $\mu\text{g/L}$ e incluso a niveles de ng/L . Los métodos de preconcentración utilizados abarcan prácticamente todos los comentados en el apartado A.3.1.: extracción líquido-líquido, extracción sólido-líquido, preconcentración en membrana y destilación, siendo la extracción sólido-líquido la más utilizada debido a la posibilidad de incorporación en línea al sistema cromatográfico (90).

TABLA III. Análisis de clorofenoles por cromatografía líquida de partición (LC).

CLOROFENOL	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	MUESTRA	OBSERVACIONES	REFERENCIA
Clorofenoles	Separon SGX C ₁₈	ACN-H ₃ PO ₄ (95:5)	UV	Agua	L.D.: 0.12-0.38 µg/L Precon.: C ₈ , C ₁₈ , fenilo	80
FCP	Spherisorb ODS-2	Metanol-H ₂ SO ₄	UV, EQ	Agua	L.D.: 4-85 µg/L (UV) L.D.: 0.04-0.59 µg/L (EQ)	82
FCP	Spherisorb ODS-2	AcOH-Metanol	UV, EQ	Agua	L.D.: 0.02-0.1 µg/L Precon: PLRP-S	90
FCP	LC-18	Metanol-ACN-TFA	UV	Agua	L.D.: 0.1-1.5 ng/L Precon.: GCB	100
FCP	Nucleosil 5 C ₁₈	NH ₄ Ac-ACN-Metanol (28:17:5)	UV	—	Linealidad: 5-50 mg/L	105
FCP	HP ODS-2	Metanol-AcOH	UV	Aguas	Linealidad: 1-20 µg/L Precon: PLRP-S, par iónico	110
Monoclorofenoles	LiChrospher RP-18e	Metanol-H ₃ PO ₄ (45:55)	UV	Aguas	L.D.: 0.12-0.42 mg/L Precon. L-L y S-L	169
Pentaclorofenol	LiChrosorb RP-C ₁₈	Metanol-NaH ₂ PO ₄ (90:10)	F	Suero	L.D.: 400 ng/L Dansilderivado	173
Clorofenoles	LiChrospher 100 RP8	Metanol-propanol-tampón McIlvaine	EQ	Agua	L.D.: 55 pg-19 ng	174
Clorofenoles	Hypersil ODS	Metanol-KNO ₃ -H ₂ SO ₄	EQ	Agua	L.D.: 0.6 pg	176

Clorofenoles	LiChrospher 100 RP-18	ACN-Metanol- NaH ₂ PO ₄ (19:17:64)	EQ	Agua de mar	L.D.: 0.1-0.04 µg/L Precon.: PS-DVB	184
Clorofenoles	Spherisorb ODS-2	Metanol-AcOH (70:30)	MS	—	L.D.: 400 ng/g	185
Clorofenoles	LiChrosorb RP-18	Metanol-tampón imidazola	QL	Agua	L.D.: 0.01-0.1 µg/L	188
Clorofenoles	LiChrosorb RP-C ₁₈	Metanol-Agua	UV	Productos de descomposición	L.D.: 2 µg/L Derivatización: 4-AAP	194
Clorofenoles	LiChrospher RP-18	ACN-AcOH	UV, F	Aguas	L.D.: 1-14 ng Oxidación con Ce(IV)	297

L.D.: Límite de detección.

FCP: Fenoles contaminantes prioritarios.

Detectores: UV: ultravioleta, EQ: electroquímico, F: fluorimétrico, MS: espectrometría de masas, QL: quimioluminiscente.

ACN: Acetonitrilo. AcOH: Ácido acético. THF: tetrahidrofurano. TFA: ácido trifluoroacético.

Preconcentración: L-L: líquido-líquido. S-L: sólido-líquido. GCB: negro de carbón grafitizado. PS-DVB: poliestireno-divinilbenceno.

En LC es posible utilizar reacciones de derivatización, tanto pre-columna como post-columna, con objeto de aumentar la selectividad y sensibilidad en la determinación cromatográfica, pero con el problema de que se necesita más tiempo para la preparación de la muestra. En este sentido cabe destacar la revisión bibliográfica de Dem'yanov sobre los diferentes métodos de derivatización de fenoles para su determinación en LC (191).

En el primer caso se encuentra la formación de derivados fluorescentes, los dansilderivados o los 2-fluorensulfonil derivados, con los que se alcanzan límites de detección del orden de ng/L (89,173,192). Mediante la reacción con 4-AAP, Li y Kemp (193) obtienen un límite de detección de 40 nM utilizando detección electroquímica mientras que Fayyad y col. (194) obtienen un límite de detección de 2 µg/L con detección UV. La formación de los correspondientes derivados dansilados permite, igualmente, la determinación de los fenoles mediante detección quimioluminiscente alcanzando límites de detección entre 0.01-0.1 µg/L (188). Por otra parte, la formación de los correspondientes derivados acetilados ha permitido confirmar la presencia de fenoles en muestras de agua a niveles de ng/L utilizando detección UV (98).

En la modalidad post-columna, Bigley y Grob (195) emplean la reacción con 4-AAP consiguiendo límites de detección del orden de 0.1 a 0.5 mg/L. Kwakman y col. (196) mediante la reacción con bis-(2-nitrofenil)oxalato obtienen límites de detección inferiores a los picogramos; mientras que Lamprecht y Huber (197), mediante la oxidación con Ce(IV) y posterior detección fluorescente del Ce(III) obtienen límites de detección entre 1-14 ng.

En los últimos años, la utilización de diferentes métodos matemáticos y diseños experimentales ha permitido optimizar las condiciones para la separación e identificación de los fenoles mediante LC en fase reversa. La fase móvil es el parámetro que, en general, más se optimiza tanto en isocrático (63,198)

como en gradiente (199,200). El efecto del pH y de la temperatura han sido tenidos en cuenta en la optimización de dicha fase móvil. En el caso isocrático la separación óptima se obtiene utilizando fases móviles cuaternarias compuestas por metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano y agua; no obstante, el tiempo de elución suele ser grande (~50 min.). En cuanto a la separación en gradiente, la fase móvil se compone únicamente de metanol-ácido acético, optimizándose la fase móvil inicial (% metanol) así como el gradiente (% metanol/min). En este caso el tiempo de elución máximo es de alrededor de 20 minutos. En ambos casos (isocrático y gradiente) los demás parámetros cromatográficos (flujo, columna, detector) permanecen constantes.

Un estudio más completo es el realizado por Chee y col. (201) que aplicando un tipo de diseño factorial fraccionado, denominado matriz de diseño ortogonal (OAD), optimizan varios parámetros a la vez como son: varias columnas C_{18} de diferentes fabricantes, el contenido de metanol y acetonitrilo en la fase móvil, la duración del gradiente de elución y el flujo. En este sentido, llegan a la conclusión que el tipo columna utilizada es el factor que más influencia significativa tiene en la optimización de las condiciones para la separación satisfactoria de los fenoles, mientras que el tiempo inicial de la fase móvil, la duración del gradiente y el flujo no influyen significativamente en dicha separación a los niveles utilizados, lo cual no significa que no sean parámetros importantes.

Por otra parte, a partir de las propiedades físico-químicas de los fenoles se ha estudiado la retención de estos en función de la fase móvil utilizada. Entre las propiedades consideradas están el volumen de Van der Waals y el potencial de ionización (202), la polaridad, el enlace de hidrógeno y el coeficiente de reparto n-octanol/agua (203). Otras características de la fase móvil y estacionaria tales como los parámetros solvatocrómicos de Kamlet-Taft, el

parámetro de solubilidad de Hildrebrand y el parámetro E_r^N de Dimroth-Reichardt, han sido igualmente utilizados para predecir la retención de los fenoles utilizando diferentes fases móviles y estacionarias (203,204). Los resultados obtenidos sugieren que la retención de los fenoles en el sistema metanol-agua esta controlada por la solvofobicidad de la fase móvil.

A.3.3.b. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) se encuentra entre las técnicas que más frecuentemente se utiliza en el análisis de fenoles, debido a su alta eficacia en la separación, velocidad de análisis y sensibilidad de detección. Aunque la mayoría de los fenoles presentan una alta polaridad y baja presión de vapor, circunstancias que dificultan su análisis, hay muchos métodos para su determinación por GC. Los fenoles más volátiles y de bajo peso molecular pueden separarse directamente, sin pretratamiento; pero para los homólogos superiores y especialmente los polifenoles se requiere la formación de un derivado.

La alta polaridad de los fenoles, y en particular de los clorofenoles, limita en gran medida el número de fases estacionarias posibles. No obstante, existen una gran variedad de posibilidades recogidas en diferentes revisiones bibliográficas (58,59), pudiendo considerarse dos grandes grupos:

- Métodos que utilizan columnas empaquetadas tales como poliéster desactivado con H_3PO_4 de nombre comercial SP-1240-DA (205), Tenax (206), SP-2250 (207), SP-2401 (187), OV-17 (208), carbón grafitizado (209), etc.

- Métodos que utilizan la cromatografía gaseosa en columna capilar (CGC) (210-212), que aunque en principio ofrecían dificultades para los compuestos ácidos por la reactividad con las paredes del vidrio, éstas han sido subsanadas por nuevos tratamientos o por el uso de las nuevas columnas de

sílice fundida (FSCC) con mayor inercia química, que permiten separar los fenoles más ácidos (61,83,96,213).

Williams y col. (214) demuestran, a partir de 50 compuestos fenólicos, que las columnas con una menor polaridad presentan mayor eficacia que las columnas de más polares siendo capaces de separar 41 de los 50 fenoles considerados. Por otra parte, a partir de tres columnas capilares diferentes Renner (215) lleva a cabo un estudio sobre la relación existente entre los tiempos de retención y los valores de pKa y toxicidad de los clorofenoles.

En cuanto a los detectores, los más utilizados son el de ionización de llama (FID), captura electrónica (ECD) y espectrometría de masas (MS); sin embargo, se hace también uso de otros detectores como el de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (214,216,217), el detector nitrógeno-fosforo (NPD) (218), la conductividad electrolítica (219), la detección electroquímica (207), la emisión atómica (ICP-AES) (99) y la espectroscopía de movilidad iónica (213). En ocasiones se emplean dos detectores simultáneamente, como el FID y el ECD (220).

Las características cromatográficas de los fenoles se pueden mejorar mediante la formación de derivados volátiles. Estos derivados presentan una menor polaridad y reactividad por lo que tienen mejores características cromatográficas que los propios fenoles. Si en el derivado se incluyen halógenos, en general se mejora el límite de detección y la selectividad con el uso del detector adecuado. Los detectores más utilizados son el ECD y la MS tanto para derivados halogenados (221,222), obtenidos a partir de una gran variedad de reactivos, como acetilados (102,117,125,223), siendo estos últimos los más utilizados. Cabe destacar la revisión bibliográfica de Dem'yanov sobre los diferentes métodos de derivatización de fenoles para su determinación en GC (191).

Entre los reactivos capaces de formar derivados halogenados se encuentran los anhídridos de haloácidos como monocloroacético (224), monofluoroacético, trifluoroacético, pentafluoropropiónico y heptafluorobutírico (222). Como reactivos para introducir el grupo pentafluorofenilo se pueden usar el cloruro o bromuro de pentafluorobenzilo (83,221,225), el α -bromopentafluorotolueno (226), el cloruro de pentafluorofenacetilo y el cloruro de pentafluorofenoxiacetilo, siendo el primero el más frecuente.

Dano y col. (227) llevan a cabo un estudio comparativo de los derivados acetilados y pentafluorobencilados de clorofenoles en agua, obteniendo como resultado que los derivados acetilados se separan completamente en las condiciones de trabajo, no así los derivados pentafluorobencilados. Al ser los tiempos de retención diferentes para ambos derivados, es posible la identificación de cada uno de los clorofenoles sin ningún tipo de interferencia, por lo que ambos procedimientos son complementarios. Por otra parte, la acetilación es más eficaz para los fenoles policlorados mientras que, por el contrario, la pentafluorobenzilación da mejores resultados para aquellos fenoles menos clorados. Igualmente, Hajslova y col. (228) determinan varios clorofenoles utilizando diferentes derivados observando que el comportamiento cromatográfico de los derivados acetilados y metilados en una columna FSCC puede considerarse aceptable, mientras que los trifluoroacetatos y los obtenidos mediante anhídrido pentafluoropropiónico y heptafluorobutírico no son suficientemente estables y no se consiguen resultados reproducibles. En cuanto a la pentafluorobencilación, esta hace incrementar la respuesta relativa con respecto a los derivados anteriores en dos ordenes de magnitud para los mono- y diclorofenoles pero no así para el pentaclorofenol y los tri- y tetraclorofenoles, por lo que en el caso de que solo estos últimos fueran a ser analizados, recomiendan utilizar la acetilación al ser más simple en cuanto a su realización.

Otros derivados se han obtenido por metilación con yodometano (211), metanol/H₂SO₄ (229), metanol/BF₃ (229) o con diazometano (230), por etilación con diazoetano (231), y por esterificación con N-heptafluorobutirilimidazola (230), dando buenas respuestas con ECD y MS. Por otra parte, la silanización utilizando diferentes reactivos para dar lugar a los correspondientes derivados silanizados, aumenta igualmente la sensibilidad en la determinación de fenoles utilizando tanto ECD como MS (123,221).

En general, se puede decir que la derivatización permite disminuir el límite de detección al nivel de µg/L. Esto se debe al aumento de la sensibilidad y a la mayor recuperación con que se pueden extraer y concentrar los derivados de los fenoles.

La utilización de la quimiometría en la determinación de clorofenoles mediante GC ha sido utilizada por diferentes autores. Así, Korzekwa y col. (232) aplican un método de mínimos cuadrados para la resolución de picos cromatográficos solapados pudiendo detectar datos erróneos; mientras que Jurasek y col. (233) utilizan un programa basado en el reconocimiento de pautas junto con la búsqueda en una librería de los correspondientes espectros de masa de los clorofenoles, para completar la información sobre una muestra desconocida.

Finalmente, y como en casos anteriores, en la tabla IV se resumen las características analíticas de los distintos métodos que utilizan la GC para el análisis de clorofenoles.

TABLA IV. Análisis de clorofenoles por cromatografía gaseosa (GC).

CLOROFENOL	SISTEMA CROMATOGRÁFICO	DERIVATIZACIÓN	TEMPERATURA °C (°C/min)	MUESTRA	OBSERVACIONES	REFERENCIA
Monoclorofenoles	FSCC-ECD, DB-5	Pentafluorobenzoatos	40-150 (25)-190 (2)-250 (5)	Agua	L.D. ≤ 2 ng/L	61
Clorofenoles	FSCC-FID, Dimetilpolisiloxano	Acetilación	45-150 (5)	—	Linealidad: 0.2-3 mg/L	64
Clorofenoles	FSCC-ECD, SPB-5	Pentafluorobenzoatos	70-105 (30)-240 (4)	Orina	L.D.: 0.5-2 µg/L Precon: C ₁₈	83
Clorofenoles	GC-ICP-AES, BP-5	—	80-250 (15)	Agua	Linealidad: 0.1-10 mg/L L.D.: 0.07-0.48 µg/L	99
Clorofenoles	CGC-ECD, DB-225	Acetilación	60-220 (2)	Aire	L.D.: 1 ng/m ³ Precon.: Porapak-N	102
FCP	GC-FID,MS, PTE-5	Acetilación	30-190 (10)	—	L.D.: 0.6-32 µg/L (FID) L.D.: 0.01-1.6 µg/L (MS) Microextracción S-L	117
FCP	CG-FID, SP-1240-DA	—	110-170 (25)	Agua de mar	L.D.: 10-35 µg/L	205
Clorofenoles	CGC-EQ, SP-2250	Acetilación	—	Orina	L.D.: 1 µg/L	207
Clorofenoles	CGC-ECD,MS, DB-5	Acetilación	70-120 (30)-180 (2)	Papel	L.D.: 0.5-1 µg/L	210
Clorofenoles	GC-N-P, DB-1	Cianoetildimetilsilil éteres	120-280 (12)	—	L.D.: 0.5 pg	218
Pentaclorofenol	CGC-CE,MS, DB-1	Acetilación	160-220 (5)	Vino Corcho	L.D.: 1 µg/L L.D.: 10 µg/kg	219

Clorofenoles	GC-ECD-FID, DB-5	—	50-250 (5)	Aguas	L.D.: 1 µg/L	221
Clorofenoles	FSCC-ECD, OV-1	Pentafluorobenzoatos	70-200	Pesticidas	L.D.: 0.1 µg/L	221
Clorofenoles	FSCC-ECD	Pentafluorobenzoatos	—	Pesticidas	L.D.: 0.5-5 pg	226
Clorofenoles	FSCC-ECD, HP-1	Metilación Acetilación Pentafluorobenzoatos	90-230 (8) 140-245 (7)	—	L.D.: 1 µg/L	228
Clorofenoles	GC-ECD	Metilación	—	Cereales	L.D.: 5 µg/L	229
Clorofenoles	CGC-MS, HP-Ultra	HFBI-derivados	70-150(3)-280(50)	Orina	L.D.: 0.1-1 µg/L	230
Clorofenoles	FSCC-MS, Dimetilpolisiloxano	Diazoetano	70-220 (6)	Orina	L.D.: 1 µg/L	231

GC: Cromatografía gaseosa. CGC: GC en columna capilar. FSCC: CGC en columna de sílice fundida.

Detectores: FID: Ionización de llama, ECD: captura electrónica, MS: espectrometría de masas, N-P: nitrógeno-fósforo, EQ: electroquímico,

CE: conductividad electrolítica.. FTIR: espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier.

FCP: fenoles contaminantes prioritarios. HFBI: N-heptafluorobutirilimidazola.

A.3.3.c. Cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina (TLC) no es un método muy utilizado para la determinación de clorofenoles siendo, en ocasiones, complementario de otros métodos cromatográficos (207). En general, la separación de los clorofenoles se lleva a cabo en placas de gel de sílice existiendo una gran variedad de ellas (207,234). En ocasiones, la gel de sílice está impregnada con otros compuestos como NaNO_2 (235), Al(III) y Cu(II) (236) o tensioactivos aniónicos (237). No obstante también se emplean placas del tipo RP-2, RP-8 y RP-18, que consisten en cadenas de alquilo enlazadas químicamente a una fase estacionaria de sílice (238) y placas de celulosa (239).

Las fases móviles o eluyentes utilizados para el desarrollo del cromatograma suelen ser mezclas de disolventes polares y apolares (fase reversa) aunque también se utilizan mezclas de disolventes apolares (fase normal). Estos eluyentes varían dependiendo de las condiciones de trabajo, pero normalmente se componen de dos o tres disolventes tales como benceno, tolueno, acetona, éter etílico, metanol, ácido acético, ácido fórmico, amoníaco, etc. (207,239-241).

La detección se lleva a cabo con diferentes reactivos cromogénicos que dan lugar a compuestos coloreados fácilmente detectables al reaccionar con los fenoles (242). Así, no es de extrañar que, normalmente, se utilicen los mismos reactivos que se emplean en espectrofotometría UV-VIS tales como la 4-aminoantipirina (4-AAP) (240,243) y todos aquellos que forman colorantes azoicos (240,244). También, se utilizan otros reactivos tales como el nitrato de plata (207,245), el nitrato de torio (IV) (246), el ferricianuro férrico (238) y el fósforo fluorescente (241). La detección de los compuestos formados se realiza, en general, mediante la utilización de la radiación UV aunque también puede hacerse visualmente (247).

La TLC ha sido también utilizada para estudiar la relación entre la estructura y la actividad biológica de los clorofenoles (248). En este sentido la dosis letal mínima y su toxicidad han sido correlacionados con sus valores de pKa y los índices topológicos calculados mediante dicha técnica.

En la tabla V se resumen las características más importantes de los diferentes métodos que utilizan la TLC para la determinación de clorofenoles.

A.3.3.d. Otros métodos cromatográficos

Otra técnica cromatográfica utilizada en el análisis de clorofenoles es la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC). Esta técnica cromatográfica se basa en la separación de los diferentes compuestos mediante la utilización como fase móvil de un gas, normalmente CO₂, en estado supercrítico. En cuanto a las columnas utilizadas como fase estacionaria estas pueden ser capilares o empaquetadas. Ong y col. (250) comparan la selectividad de dos fases estacionarias en columnas capilares utilizando una mezcla de CO₂ y Freón-22 como fase móvil y detección UV para la determinación de los fenoles contaminantes prioritarios de la USEPA, obteniendo unos límites de detección entre 0.01 y 0.38 mg/L. La utilización de Freón-22 reduce los tiempos de retención de los fenoles y aumenta su sensibilidad comparado con la utilización de CO₂ puro (251,252). Por otra parte, Dressman y col. (253) llevan a cabo la determinación de estos mismos fenoles utilizando CO₂ modificado con metanol (1%) y detección electroquímica, obteniendo unos límites de detección entre 0.72 y 80 ng.

TABLA V. Análisis de clorofenoles por cromatografía de capa fina (TLC).

CLOROFENOL	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	REACTIVO (DETECCIÓN)	MUESTRA	OBSERVACIONES	REFERENCIA
Clorofenoles	Silufol	C ₆ H ₆ -etanol, hexano-acetona	AgNO ₃ -radiación UV	Orina	L.D.: 1 mg/L	207
Clorofenoles	RP-18, Sil C ₁₈ -50, OPTI-UP C ₁₂ con tensioactivos aniónicos	Metanol-NH ₃	NO ₂ -NH ₃	—	Comparación de diferentes placas	237
Clorofenoles	RP-2, RP-8, RP-18	Metanol-agua, C ₆ H ₆ -metanol CHCl ₃ -isopropanol,	Fe[Fe(CN) ₆]	—	Influencia del eluyente. Fase normal y reversa	238
Clorofenoles	Silufol, Kieselgel G	C ₆ H ₆ -acetona	ácido sulfanílico 4-AAP - K ₃ Fe(CN) ₆	—	L.D.: 0.4-4 µg	240
Pentaclorofenol	Gel de Si	Tolueno-metanol	Fósforo (reflectancia densiométrica)	Agua Miel	Linealidad: 300-500 ng Precon.: C ₁₈	241
Clorofenoles	Gel de Si	CHCl ₃ -metanol	ácido octanílico o-dianisidina	Aguas	L.D.: 1-5 µg	244
Pentaclorofenol	Gel de Si	AcOH-hexano-acetona-metanol	AgNO ₃ -radiación UV	Sebo	L.D. < 50 ng	245
Clorofenoles	Gel de Si	Metanol	Th(NO ₃) ₄ · 6 H ₂ O	—	L.D.: 1-3 µg	246
Pentaclorofenol	Gel de Si con detector fluorescente	Tolueno- acetona	Reflectancia densiométrica Radiación UV	Cuero	L.D.: 3 ng	249

L.D.: límite de detección.

4-AAP: 4-aminoantipirina. AcOH: ácido acético.

A.3.4. Métodos electroanalíticos

En la tabla VI se resumen las características principales de los diferentes métodos electroquímicos encontrados en la bibliografía para la determinación de clorofenoles. Las técnicas más empleadas son la voltamperometría cíclica (254-256), la voltamperometría diferencial de impulsos (255-259), la voltamperometría de redisolución catódica diferencial de impulsos (260), la voltamperometría de barrido lineal (257), la voltamperometría de onda cuadrada (259) y la polarografía diferencial de impulsos (254). Como electrodo de trabajo se utiliza el electrodo de carbono ya sea vitrificado o en pasta pudiendo estar modificado, y como electrodos de referencia el de calomelanos saturado y el de Ag/AgCl.

Por otro lado, es bien conocida la gran sensibilidad de la detección electroquímica en HPLC en la determinación de fenoles. Esto ha hecho que se produzca un gran desarrollo de diferentes electrodos para su posterior utilización en dicha técnica. Así, Liberti y col. (261) desarrollan un electrodo de carbón vitrificado en polietileno el cual es también empleado en voltamperometrías anódicas de fenoles. Del mismo modo Weisshaar y col. (262) desarrollan un electrodo denominado Kelgraf (Kel-F-graphite) el cual es compatible con una gran variedad de disolventes orgánicos y posee una gran estabilidad térmica. El límite de detección para este electrodo en la determinación de fenoles, está entre 0.15 y 0.8 $\mu\text{g/L}$.

La utilización conjunta del análisis en continuo y los métodos electroquímicos ha sido tratada por diferentes autores. En este sentido, Cañete y col. (256) llevan a cabo la determinación individual y multicomponente de compuestos fenólicos a concentraciones inferiores a 1 mg/L mediante voltamperometría cíclica utilizando un sistema FIA. Yañez Sedeño y col. (263) determinan pentaclorofenol mediante un sistema FIA con detección amperométrica obteniendo un límite de detección de 3.7 $\mu\text{g/L}$. Christophersen y Cardwell (264) determinan

TABLA VI. Análisis de clorofenoles por métodos electroanalíticos.

CLOROFENOL	TÉCNICA	ELECTRODO	MUESTRA	OBSERVACIONES	REFERENCIA
Pentaclorofenol	Polarografía diferencial de impulsos	Gota de mercurio	—	L.D. < 27 mg/L	254
Clorofenoles	Voltamperometría diferencial de impulsos	Carbono vitrificado	—	L.D.: 0.5-3.4 mg/L Linealidad: 0-100 mg/L	255
2,4-diclorofenol	Voltamperometría cíclica derivada-FIA	Pasta de carbono	Aguas	L.D.: 20 µg/L Determinación multicomponente	256
Pentaclorofenol	Voltamperometría diferencial de impulsos	Carbono vitrificado	Fungicida	L.D.: 0.45 µM Linealidad: 2-10 µM	257
Pentaclorofenol	Voltamperometría de barrido lineal	Carbono vitrificado	Fungicida	L.D.: 3.6 µM Linealidad: 10-100 µM	257
Pentaclorofenol	Voltamperometría de onda cuadrada	Pasta de carbono-gel de sílice	Fungicida	L.D.: 4.5 µg/L Linealidad: 0.1-1 µM	258
4-cloro-3-metilfenol	Voltamperometría diferencial de impulsos	Carbono vitrificado	Cosmético	L.D.: 0.2 µM Linealidad: 0.8-70 µM	259
Pentaclorofenol	Voltamperometría de barrido lineal-FIA	Carbono vitrificado	Agua	L.D.: 3.7 µg/L Linealidad: 10-100 µg/L	263
Clorofenoles	Culombimetría, Amperometría-FIA	Carbono	Aguas	Linealidad: 0.1-20 mg/L	264
4-cloro-3-metilfenol	Biosensor amperométrico	Grafito-tirosinasa	—	L.D.: 13 µM Linealidad: 40-360 µM	265
4-clorofenol	Biosensor amperométrico	Resina grafito-epoxida-tirosinasa	—	L.D.: 1 µM	266

L.D.: límite de detección.

FIA: análisis por inyección en flujo.

la cantidad total de fenoles empleando un sistema FIA acoplado a dos detectores (culombimétrico y amperométrico) utilizados para la eliminación de interferencias y detección de los fenoles, respectivamente. Mediante este sistema mejoran la exactitud en su determinación en presencia de fenoles sustituidos, y en particular para- sustituidos y/o nitrofenoles, con respecto al método de la 4-AAP.

Wang y col. (265-267) utilizan un biosensor amperométrico para la determinación de compuestos fenólicos basado en la utilización de la enzima tirosinasa la cual da lugar a las correspondientes productos quinónicos electroactivos. Los estudios fueron realizados tanto manualmente como a través de un sistema FIA obteniendo un límite de detección para el primer caso entre 6 y 29 μM y para el segundo caso entre 1 y 15 μM . Otro biosensor amperométrico basado en la enzima tirosinasa es el desarrollado por Kotte y col. (268), el cual incorpora un mediador redox que hace aumentar la sensibilidad mediante amplificación de la señal analítica, obteniendo un límite de detección de 0.25 nM. Igualmente, Hall y col. (269) determinan diferentes fenoles utilizando un electrodo enzimático basado en la enzima polifenoloxidasas la cual es retenida en una membrana de nylon, obteniendo una respuesta lineal a concentraciones superiores a 100 μM . En este sentido cabe destacar la revisión llevada a cabo por Marko-Varga y col. (270) sobre la utilización de diferentes enzimas tales como lacasas, peroxidasas y tirosinasas, para la determinación de fenoles mediante sensores amperométricos.

A.3.5. Otros métodos

Una de las técnicas espectroscópicas capaz de llegar a concentraciones de 20 µg/L en determinaciones directas es la fluorimetría (271). Igualmente, la espectroscopía Raman ha mostrado su utilidad de medida directa de fenoles a niveles de concentración del orden de mg/L ya sea utilizando un patrón interno o análisis multicomponente (272).

Varios autores han utilizado para la determinación de los fenoles el efecto inhibitor o desactivador (“quenching”) en determinadas reacciones. Así, Donkerbroek y col. (273), a través de la desactivación de la fosforescencia a temperatura ambiente del biacetilo por parte de los clorofenoles, obtienen unos límites de detección entre 0.01 y 1 µM; Pérez Ruiz y col. (274) utilizan el efecto inhibitor de los fenoles en la reacción fotoquímica entre la floxina y el EDTA para su determinación a niveles de µM; mientras que Zhuang y col. (275) llevan a cabo la determinación de fenoles volátiles mediante un método FIA basado en la desactivación de la quimioluminiscencia del p-clorobencenodiazonio en presencia de H₂O₂, obteniendo un límite de detección entre 15 y 30 µg/L.

Una técnica, desarrollada durante los últimos años para la determinación de fenoles contaminantes prioritarios, ha sido la electroforesis capilar. En este sentido, Li y Locke (276) estudian la influencia del pH, concentración de la disolución reguladora, voltaje aplicado y cantidad de muestra inyectada, en la resolución de dichos fenoles a niveles de mg/L, mientras que Turnes y col. (277) estudian diferentes alternativas de esta técnica para la monitorización de pentaclorofenol a niveles de ng/L en muestras de agua.

Otra técnica, desarrollada por Praus y Dombek (278-280) para la separación y determinación de clorofenoles, es la isotacoforesis capilar ya sea mediante la utilización de varios sistemas a diferentes pH de acuerdo con sus

valores de pKa, o con un único sistema adicionando aditivos neutros tales como β -ciclodextrinas o polientilenglicol. Los límites de detección obtenidos varían entre 10 y 50 ng/L. Preconcentrando previamente los clorofenoles mediante un proceso de destilación, estos autores llevan a cabo su determinación en aguas de río e industriales a nivel de mg/L (122).

Por último, cabe destacar el desarrollo de un inmunoensayo para la determinación de pentaclorofenol en muestras de agua con un límite de detección entre 30 y 40 $\mu\text{g/L}$ (281), un método de detección selectiva de impurezas de fenol en agua basado en un proceso de ablación e ionización mediante un láser y posterior detección con MS, obteniendo un límite de detección de 0.1 $\mu\text{g/L}$ (282) y un método para la caracterización y análisis de mezclas de fenoles mediante resonancia magnética nuclear de ^{119}Sn , previa derivatización con óxido de bis(tri-n-butilestaño) (283).

A.4. LEGISLACIÓN SOBRE CONTENIDOS MÁXIMOS

En los apartados anteriores se han revisado tanto los usos y toxicidad de los fenoles como los diferentes métodos para su determinación. Debido a los riesgos que para el medio ambiente y la salud pública suponen estos compuestos, diferentes países han establecido unas normas de calidad para el agua, según el uso de la misma, así como para otros materiales.

La adhesión de España a la Comunidad Europea hizo necesario armonizar la legislación a las disposiciones comunitarias en cuanto a la reglamentación técnico-sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público, por lo que en 1990 fue derogada la anterior reglamentación de 1982 que fijaba una concentración máxima admisible (MAC) de 1 µg/L de fenoles totales, estableciéndose un nuevo reglamento de acuerdo a la legislación comunitaria con una MAC de 0.5 µg/L de fenoles totales (284). Por otra parte, en 1984 se fijó un límite en la industria maderera para el empleo de la sal sódica del pentaclorofenol como conservante, prohibiéndolo en el caso de envases de alimentos (285).

Para el análisis de aguas el método oficial de referencia en la Comunidad Europea, y por consiguiente en España, es el espectrofotométrico que utiliza 4-aminoantipirina (4-AAP), con precisión del 30%, exactitud del 50% y límite de detección de 5 µg/L (133), siendo igualmente oficial en EEUU (134) y en las normas internacionales (135). No obstante, estas normas y la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (USEPA) también prevén la utilización de la cromatografía gaseosa con detección de captura electrónica o ionización en llama (286,287). En el caso de la determinación general de contaminantes prioritarios incluidos los fenoles, la USEPA recomienda la cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas (288,289).

Por otra parte, desde 1988 la Comunidad Europea fija un objetivo de calidad para el pentaclorofenol de 2 µg/L en aguas superficiales recomendando como métodos de referencia la LC y GC-ECD con límites de determinación de 2 µg/L para efluentes, 0.1 µg/L para aguas y 1 µg/Kg para sedimentos y organismos, con una precisión del 50% para una concentración doble del límite de determinación (290,291).

Otras directivas que fijan la calidad de las aguas, en cuanto a su contenido de fenoles, tanto las superficiales destinadas a la producción de agua potable, las de baño, así como las continentales aptas para la vida de los peces, han sido publicadas por la Comunidad Europea (292-294).

El hecho de que la legislación de los países fijen diferentes límites se debe al efecto económico negativo que se produce sobre la industria al regular una sustancia, pues, cuanto más bajos sean los niveles permitidos, mas cara será la depuración de los residuos industriales, lo que encarecerá los costes de producción.

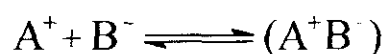
A.5. LOS PARES IÓNICOS EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

En los últimos años la formación de asociaciones iónicas o pares iónicos, a experimentado un gran desarrollo en diferentes métodos analíticos, debido a su gran versatilidad y a la posibilidad de aumentar tanto la selectividad como la sensibilidad de los diferentes métodos analíticos. El estudio de la influencia del tamaño de los contraiones y sus características físico-químicas han permitido la determinación selectiva de numerosos analitos utilizando métodos tanto espectroscópicos como electroquímicos (295,296).

A.5.1. Propiedades

Los pares iónicos son asociaciones originadas por interacciones electrostáticas entre iones de carga opuesta dando lugar a productos eléctricamente neutros. Por lo tanto, en la formación de un par iónico predominan las fuerzas físicas más que las químicas.

La asociación se puede expresar por la siguiente reacción (297):



definiéndose la constante de asociación como:

$$K = \frac{(A^{+}B^{-})}{(A^{+})(B^{-})}$$

El valor de esta constante de asociación indica si la formación del par iónico es o no significativa.

La formación del par iónico se ve favorecida por la disminución de la constante dieléctrica. Así, todos aquellos disolventes que poseen una constante dieléctrica baja, del orden de 20-30, favorecen en su seno, la formación de los pares iónicos. En disolventes de polaridad más baja, en los que la solvatación es débil, la unión iónica es fuerte, ya que no hay moléculas de disolvente entre el par de iones, por lo que se habla de par iónico compacto, mientras que en disolventes de polaridad más elevada, en los que la solvatación es más intensa, la unión iónica es débil, pudiendo los iones estar separados por una o varias capas de moléculas de disolvente, lo que se conoce como par iónico suelto.

La presencia de electrólitos distintos a los involucrados en la asociación ejerce una influencia positiva en la formación del par iónico que es debida a dos causas esenciales:

a) Concentraciones electrolíticas altas hacen disminuir la hidratación sobre los iones formadores del par iónico y, por tanto, aumentan su carácter hidrófobo.

b) La constante dieléctrica del medio disminuye con la concentración electrolítica. Así, por ejemplo, el valor de $\epsilon=80$ (agua pura) disminuye a $\epsilon=60$ en HCl 0.5 M, en una disolución de LiCl 1.5 M o en una disolución de NaCl 2.3 M.

Existe una gran variedad de reactivos formadores de pares iónicos los cuales se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- Colorantes del grupo de la fluoresceína que actúan como contraiones cargados negativamente (aniónicos). Entre ellos se encuentran el Rojo de Bromopirgalol, la eritrosina, el azul de bromofenol, etc. Estos colorantes proporcionan las suficientes características luminiscentes como para poder determinar el par iónico fluorimétricamente.

- Colorantes básicos que presentan en su molécula carga positiva y, por tanto, actúan como contraiones catiónicos. Dentro de este grupo tenemos los colorantes del tipo xantenos y a los del grupo de la Rodamina B. La determinación del par iónico se puede realizar, en este caso, tanto espectrofotométrica como fluorimétricamente.

- Moléculas de cadena larga con carácter tensioactivo, tanto aniónicos (laurilsulfato sódico) como catiónicos (sales de amonio cuaternario).

- Cationes organometálicos formados por grupos fenilos cercanos a un cierto átomo en estado positivo de oxidación y que se denominan iones polifenilonios tales como el tetrafenilarsonio, el tetrafenilfosfonio y el trifeniltannonio.

- Quelatos cargados, tanto positiva como negativamente, como, por ejemplo, el $\text{Fe}(1,10\text{-fenantrolina})_3^{2+}$ y el $\text{Fe}(2,2\text{-bipiridilo})_3^{2+}$.

- Compuestos macrocíclicos que forman complejos de extraordinaria estabilidad siendo los más utilizados los éteres corona y cripta.

En este sentido, cabe destacar la revisión bibliográfica llevada a cabo por Toei (298) sobre los reactivos formadores de pares iónicos más ampliamente utilizados en química analítica.

A.5.2. Extracción líquido-líquido

Debido al carácter neutro del producto obtenido en una asociación iónica este puede ser extraído mediante disolventes apolares. La extracción de los pares iónicos, depende de todos aquellos parámetros que influyen en la formación de estos y que han sido comentados en el apartado anterior. Por otra

parte, los pares iónicos pueden ser considerados como moléculas con un cierto momento dipolar, y, por tanto, su solubilidad en disolventes orgánicos depende en gran medida de su semejanza estructural con el extractante. De esta forma, si los iones del par iónico contienen grupos orgánicos voluminosos (por ejemplo, quelatos o iones solvatados por moléculas orgánicas) cabe suponer que su extracción será favorable.

Cuando se trata de cationes metálicos, los disolventes oxigenados tienen una gran importancia en la extracción de sus pares iónicos, debido al carácter básico del átomo de oxígeno de las moléculas del disolvente, permitiendo su incorporación en la esfera de coordinación del metal, formándose un par iónico de transferencia de carga que tiene una cierta semejanza con el disolvente.

Desde el punto de vista teórico, Dubost y Colleter (299) llevan a cabo un estudio teórico del equilibrio de extracción por formación de pares iónicos, deduciendo una serie de condiciones para que su extracción sea óptima. Así, si se considera el par iónico **ABH** formado por un anión **A⁻** (derivado de un ácido **HA**) y un catión **BH⁺** (obtenido por protonación de una base **B**), el rendimiento de extracción de la base, mediante formación del par iónico, es máxima cuando:

- Los coeficientes de extracción del ácido (K_{exHA}) y de la base (K_{exB}) sean lo más pequeño posible.
- El coeficiente de extracción del par iónico (K_{exABH}), así como la concentración inicial del ácido ($C_{\text{o,HA}}$) sean lo más grande posible.
- La relación de volúmenes óptima entre la fase acuosa y la fase orgánica (Q) viene dada por:

$$Q = \frac{1}{\sqrt{K_{\text{exHA}} K_{\text{exB}}}}$$

- El pH óptimo de extracción viene dado por:

$$\text{pH} = \frac{1}{2} \log K_{\text{exHA}} - \frac{1}{2} \log K_{\text{exB}}$$

Por otra parte, la formación cuantitativa del par iónico en medio acuoso es máxima si el pH se sitúa en una zona tal que:

$$\text{pK}_1 + 2 < \text{pH} < \text{pK}_2 - 2$$

siendo pK_1 y pK_2 las constantes de acidez del ácido y la base que forman el par iónico, respectivamente.

A.5.3. Las sales de amonio cuaternario como formadores de pares iónicos y su determinación espectrofotométrica

Las sales de amonio cuaternario se obtienen por reacción de aminas terciarias con diferentes hidrocarburos saturados o aromáticos. Estas sales tienen carácter de electrólito fuerte y se utilizan frecuentemente para la extracción de aniones y complejos aniónicos metálicos por formación de pares iónicos.

La mayoría de las sales de amonio cuaternario que se utilizan se conocen por su nombre comercial, entre ellos se encuentran:

- Arquad 2HT-75 (cloruro de dioctadecildimetilamonio)
- Arquad 2C ($\text{R}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$, donde R son dieciséis átomos de carbono)
- Hyamina 1622 (cloruro de bencildiisobutilfenoxifenoxietoxietilamonio)

- Hyamina 3500 (cloruro de bencildimetilalquilamonio)
- Hyamina 2389 (cloruro de alquil(C₉-C₁₅)benciltrimetilamonio)
- Aliquat 336 (cloruro de tricaprilmetilamonio)
- Zefiramina (cloruro de tetradecildimetilbencilamonio)
- Septonex (bromuro de etoxycarbonilpentadeciltrimetilamonio)
- CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio)

Las sales de amonio cuaternario se emplean principalmente en la determinación espectrofotométrica directa de diferentes cationes metálicos mediante la formación de asociaciones iónicas con diversos complejos coloreados, aumentando, de esta forma, la sensibilidad y la selectividad en su determinación. El aumento en la sensibilidad depende, en gran medida, de la polaridad de la sal de amonio cuaternario empleada, y esta a su vez de los radicales que sustituyen a los hidrógenos en el ion amonio. Así el cloruro de hexadeciltrimetilamonio es la sal más empleada para la determinación de diversos cationes tales Ca, Mg, Cr, Ga, In, Cu(II), Bi, Fe(III), Pd(II), Al, etc. Otras sales que también se utilizan son el cloruro de metiltriocetilamonio, para la determinación de Ni(II) y Fe(III); el bromuro de tridodeciletilamonio para la determinación de Ti(IV) y Ge; el bromuro de dodeciltrimetilamonio para la determinación de Ge(IV) y Sn(IV); el bromuro de bencildodecildimetilamonio para la determinación de Be y el bromuro de tetradeciltrimetilamonio para la determinación de Al.

En general, existe una relación directa entre el peso molecular de la sal de amonio cuaternario y el factor de recuperación de la extracción, siendo este mayor a medida que aumenta el peso molecular del compuesto.

Desde el punto de vista del análisis orgánico, es escaso el uso de las sales de amonio cuaternario para la formación de pares iónicos. Sin embargo, durante los últimos años la utilización de estas sales, y más concretamente del tetrabutilamonio, ha permitido aumentar los volúmenes de ruptura en la

preconcentración de fenoles (90) así como aumentar la recuperación de estos en procesos de eliminación de disolventes (98), todo ello gracias a la formación de sus correspondientes pares iónicos. Por otra parte, cabe destacar la utilización de estas sales en la determinación simultánea de diferentes fenoles aplicando la espectrofotometría derivada (152-155,86,300).

Por último, y para un conocimiento más amplio, hay que destacar la revisión bibliográfica llevada a cabo por Rakhman'ko y col. (301) sobre la aplicación analítica de las sales de amonio cuaternario de alto peso molecular.

A.6. ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA

A.6.1. Fundamento teórico y particularidades

En un sistema de dos variables (x,y) las derivadas sucesivas representan la variación de una de ellas con respecto a la otra y vienen definidas por la expresión general:

$$\frac{d^n y}{dx^n}$$

donde **n** representa el orden de la derivada.

En espectrofotometría, las variables son absorbancia y longitud de onda (A,λ) y por tanto se obtiene la siguiente expresión general:

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n}$$

La espectrofotometría derivada aumenta considerablemente el poder de resolución dado que es más selectiva que la espectrofotometría convencional (espectros derivados de orden cero) y, por otra parte, es frecuente que una banda del espectro de absorción sea el resultado de la superposición de varias bandas que, bien por las características del espectrofotómetro o porque se trata de bandas muy estrechas, no es posible resolver en cuyo caso el uso de la derivada permite en algunos casos su correcta separación y resolución.

Con el orden de la derivada se incrementa la capacidad de resolución de las bandas espectrales aproximándose a un método de deconvolución (302). La diferenciación resalta las bandas estrechas frente a las bandas anchas tanto más,

cuanto mayor sea el orden de la derivada. Para bandas de tipo Gaussiano o Lorentziano, la amplitud D_n de la derivada de orden n está relacionada con la n -ésima potencia de la inversa del ancho de banda (w) del espectro normal (303):

$$D_n \propto \left(\frac{1}{w} \right)^n$$

De este modo, para dos bandas **a** y **b** de igual absorbancia y diferente ancho de banda, la amplitud del espectro derivado de la banda más estrecha se va haciendo mayor que la de la banda más ancha, por un factor que aumenta con el orden de la derivada:

$$\frac{D_{n,a}}{D_{n,b}} \propto \left(\frac{w_b}{w_a} \right)^n$$

Una desventaja de la espectrofotometría derivada es que el proceso de derivación degrada el valor de la relación señal/ruido (304) y por ello es necesario realizar algún tipo de filtrado, convolución o diferenciación de los espectros para mejorar dicha relación señal/ruido y, por lo tanto, disminuir el error analítico (304-307). Este hecho hace que los errores aleatorios causados por el ruido se agraven en el proceso de derivación siendo, normalmente, útil solo en el caso de que los errores sean sistemáticos debidos a interferencias espectrales causadas por solapamiento (308).

Una de las principales propiedades de los espectros derivados es su insensibilidad a la forma y estructura de la línea base lo cual ha sido utilizado para el ajuste de bandas espectrales, optimizando únicamente aquellos parámetros relacionados con las bandas de interés (309). Otra ventaja de la espectrofotometría derivada es la posibilidad de discriminar bandas espectrales anchas en favor de bandas más estrechas lo que la hace útil para la reducción del error

total (sistemático más aleatorio) en análisis cuantitativo, causado por el solapamiento espectral (310). En general, este error total se reduce al menos tres veces comparado con medidas de absorbancia.

Varios autores han estudiado la influencia de determinados factores en la precisión y exactitud de los espectros derivados, tales como el ruido instrumental (311) y la variación de la temperatura (312). En el primero de los casos se ha observado una correlación entre el ruido y el error sistemático ("bias"), mientras que en el segundo caso se han observado unos coeficientes de temperatura entre -0.1 y -0.5 %/grado atribuibles a la pequeña reducción de la curvatura del espectro de absorbancia al aumentar la temperatura, y, por lo tanto, recomiendan que la temperatura de las disoluciones estándar y de la muestra sea lo más parecida posible en el momento de hacer la medida. Kimbrell y col. (313) van más allá y utilizan un método de diseño factorial para estudiar como afectan cinco determinados factores en la precisión de una determinación analítica al utilizar las derivadas, demostrando que, en general, múltiples factores afectan a dicha precisión, como pueden ser el orden de la derivada, el método de convolución e incluso la concentración del analito que puede interactuar con el orden de la derivada. Por otra parte, Juhl y Kalivas (314) utilizan como criterio la amplificación del error, debido a la presencia de interferentes y efectos matriz, para seleccionar el orden de la derivada óptima para llevar a cabo un análisis multicomponente. Dicha amplificación del error viene representada por el número de condición de la matriz de calibración. Cuanto mayor es dicho número de condición, mayor es el error.

Mediante la utilización de las derivadas es posible la obtención de una información más exacta del sistema, como la presencia o no de interferentes o la determinación del número de componentes linealmente independientes, presentes en nuestro sistema (315,316). Esto es debido a que las derivadas ayudan en la eliminación de cierta ambigüedad en la interpretación cualitativa del sis-

tema, debido a la presencia de uno o más interferentes. Así, Karstang y Kvalheim (317) utilizan las derivadas para la corrección del fondo debido a analitos interferentes no incluidos previamente en la calibración, mientras que Gerow y Rutan (318) utilizan la primera derivada, junto con un método de deconvolución como es el filtro de Kalman, para la eliminación del fondo en el caso de que este no sea reproducible.

La espectrofotometría derivada se ha aplicado con gran profusión en los últimos años gracias al desarrollo tanto instrumental, como de métodos de análisis numérico más robustos, y prueba de ello son las numerosas revisiones bibliográficas publicadas tanto sobre los aspectos teóricos y propiedades de los espectros derivados, como sus aplicaciones prácticas (319-321).

A.6.2. Aplicaciones de la espectrofotometría derivada

La espectrofotometría derivada fue introducida al comienzo de la segunda mitad del siglo XX, y en los últimos años ha aumentado constantemente su popularidad como procedimiento de resolución espectral que permite la detección y localización de las longitudes de onda de componentes mal resueltos de espectros complejos y la reducción de interferencias debidas a la absorción de fondo. En general, se suele utilizar en espectrofotometría UV-VIS, pero también se ha aplicado en espectrofotometría IR (322,323), emisión atómica (324), fluorescencia (325,326) y fosforescencia a temperatura ambiente (327).

Posiblemente, el mayor interés de la espectrofotometría derivada está en su utilización para la determinación simultánea de dos o más componentes de una mezcla, sin menospreciar, por ello, su utilidad en el análisis de un solo componente en muestras con un fondo de absorción debido, por ejemplo, a un efecto matriz (131). Los métodos utilizados en análisis espectrofotométrico

cuantitativo de mezclas, a partir de espectros derivados, pueden dividirse en dos clases: métodos gráficos y métodos numéricos. Dentro de los métodos gráficos tenemos el denominado “zero-crossing” propuesto por O’Haver y Green (310) y que consiste en medir la señal derivada de un compuesto a la longitud de onda en la que el espectro derivado de los otros componentes de la mezcla corta el eje de abscisas, es decir, tiene un valor de cero.

Otro método gráfico es el desarrollado por Blanco y col. (328) que consiste en aplicar una regresión lineal a lo largo de múltiples longitudes de onda (MLRA) a partir de una relación entre espectros. En este caso se divide la ecuación de Lambert-Beer aplicada a una mezcla (normalmente binaria) entre el espectro estándar de uno de los compuestos puros presentes en la mezcla, obteniéndose una ecuación, en el caso de una mezcla binaria, del tipo $y = a + bx$ donde x e y son relaciones espectrales y, por lo tanto, función de la longitud de onda, mientras que a y b están relacionadas con la concentración de cada compuesto en la mezcla. García y col. (329) proponen utilizar como divisor un espectro normalizado del compuesto puro, obtenido a partir de diferentes concentraciones del mismo, para minimizar los errores. Una modificación de este método es la llevada a cabo por Salinas y col. (330) quienes aplican la primera derivada a la ecuación obtenida por Blanco y col. Sin embargo, esta modificación presenta una limitación ya que si se utiliza un rango de longitudes de onda en el cual el analito utilizado como divisor no absorbe, el ruido es exaltado de forma brusca haciendo inútil su aplicación. En consecuencia es necesario seleccionar previamente un rango de longitudes de onda en el cual el analito presenta bandas de absorción. Esta modificación ha sido utilizada conjuntamente con el método “zero-crossing” para la resolución de mezclas ternarias (331,332).

Otro método gráfico para la resolución de mezclas binarias a partir de espectros derivados, es el denominado método de compensación que consiste en comparar la mezcla frente a una disolución de referencia de uno de los componentes a diferentes concentraciones. En este caso, utilizándose una relación a diferentes longitudes de onda, se determina el punto en el cual la concentración de dicho componente es igual tanto en la mezcla como en la disolución de referencia (333). No obstante, en el caso de un gran solapamiento espectral o en la determinación de un componente minoritario en presencia de otro mayoritario, la determinación de dicho punto puede ser difícil lo que puede conllevar a resultados erróneos.

En general, se puede decir que el número de componentes que se pueden determinar simultáneamente empleando estos métodos gráficos, está limitado a dos o tres. En este sentido, desde el punto de vista del análisis inorgánico tenemos la determinación de vanadio y cobalto (334), uranio y torio (335), uranio y berilio (336), calcio y magnesio (337), Fe(II) y Fe(III) (328) y níquel y zinc (338) entre otras determinaciones. En el caso de las dos últimas se utilizó un método en continuo a través de un sistema FIA.

Sin embargo, es en la determinación de compuestos orgánicos donde la espectrofotometría derivada ha encontrado su mayor desarrollo, siendo numerosas las publicaciones en análisis medioambiental, farmacéutico, clínico, etc. Cabe destacar la aplicación de los métodos “zero-crossing” y relación espectral en la determinación de diferentes compuestos de interés clínico por parte de Morelli (339), de interés alimenticio por parte de Berzas Nevado y col. (340) y Cruces Blanco y col. (341) y de interés medioambiental por parte de Martínez Galera y col. (342).

En cuanto a los métodos numéricos, estos se basan en la aplicación de diferentes métodos matemáticos y se encuadran dentro de la calibración multivariante.

Entre los métodos más comúnmente utilizados están la regresión lineal múltiple, la regresión de componentes principales y la regresión parcial de mínimos cuadrados. Estos métodos utilizan un número de longitudes de onda mayor que el número de componentes, siendo adecuados para el caso de mezclas que contienen tres o más componentes y presentan un gran solapamiento espectral lo que hace imposible la aplicación de los métodos gráficos. Ciertos métodos presentan la ventaja de que pueden obviar la presencia de interferencias no tenidas en cuenta previamente. Una de las primeras aplicaciones de la calibración multivariante utilizando espectros derivados es la determinación de mezclas binarias y ternarias de hidrocarburos poliaromáticos. En este sentido, Tahboub y Pardue (343) demuestran que la aplicación de la derivada ofrece una ventaja significativa con respecto a la utilización de las medidas en absorbancia así como la aplicación de la calibración multivariante con respecto a la utilización de métodos basados en una sola longitud de onda. Otras aplicaciones son la determinación de diferentes iones inorgánicos (344,345) así como distintos compuestos orgánicos (153,157,346) en mezclas de tres, cuatro, cinco e incluso nueve componentes utilizando, normalmente, la primera y segunda derivada.

Finalmente, hay que destacar los estudios comparativos entre varios métodos gráficos y numéricos llevados a cabo por diferentes autores (347,348). En general se puede decir que ambos métodos presentan la misma capacidad de resolución para mezclas binarias simples, mientras que para mezclas más complicadas el mayor poder de resolución de la calibración multivariante, comparado con los métodos gráficos, es evidente. Por otra parte, a pesar de que la calibración multivariante es mucho más expeditiva y puede aplicarse a la determinación de un gran número de compuestos en una misma muestra, necesita un "software" adecuado y ciertos conocimientos matemáticos, mientras que los métodos gráficos son muchos más fáciles de implementar al ser más intuitivos.

A.7. CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE

A.7.1. Introducción

La calibración es el proceso matemático y estadístico por el que se extrae información, normalmente cuantitativa, a partir de una serie de medidas instrumentales. Es una parte de la quimiometría que, a diferencia de otros métodos quimiométricos, es puramente cuantitativa y normalmente aplicada a datos entre los cuales se sabe que existe una determinada interrelación. Desde el punto de vista espectroscópico dicha interrelación viene dada por la ley de Lambert-Beer que relaciona la señal analítica (normalmente absorbancia) con la concentración del analito.

Los métodos de calibración pueden clasificarse, al igual que los instrumentos analíticos, en diferentes ordenes desde el punto de vista tensorial (349-351). El orden de un método de calibración (n) viene dado por el tipo de tensor (número de medidas instrumentales) utilizado por dicho método. Así, un tensor de orden cero corresponde a una única medida, un tensor de orden uno corresponde a un vector de medidas (p.e., un espectro de absorción), etc. En este sentido, la utilización de datos de orden n para cada muestra en un conjunto de muestras de calibración, da lugar a un tensor de orden $n+1$, el cual es utilizado para formar un modelo de calibración de orden n . Cuanto mayor es el orden del método de calibración, mayor es la cantidad de información que se puede extraer del sistema analítico al utilizar un tensor de mayor orden y algoritmos matemáticos más potentes. En general, se conoce como calibración multivariante a todos aquellos métodos de calibración de orden uno o superior.

En todo proceso de calibración existen dos etapas bien diferenciadas: la calibración y la predicción. En la primera de estas etapas se lleva a cabo la construcción de un modelo que relacione la respuesta instrumental con la concentración de los analitos, partiendo para ello, de un conjunto representativo de muestras de calibración y aplicando un determinado método matemático. La cantidad de información que puede incluirse en esta etapa de calibración viene dada en función del orden del instrumento. Por otra parte, el orden del método de calibración que se va a utilizar, y que en principio depende del orden instrumental, es importante a la hora de decidir la cantidad de información que debe y puede incluirse en la calibración. Así, mientras que en los métodos de orden uno es imprescindible incluir todos aquellos analitos e interferentes que se suponen estarán presentes en la muestras desconocidas o de predicción, en los métodos de orden dos es posible cuantificar los analitos de interés sin haber incluido previamente las posibles interferencias en la etapa de calibración. No obstante, varios autores (352-357) han desarrollado diferentes procedimientos a partir de métodos de orden uno para corregir las posibles interferencias y/o efectos matriz no tenidos en cuenta durante esta etapa. En general, se puede decir que cuanto mayor es el orden, mayor es la cantidad de información de la que se dispone o se puede utilizar durante la etapa de calibración, lo que se traduce en un aumento de la selectividad.

Una vez establecido dicho modelo de calibración se procede a realizar la predicción que consiste en calcular la concentración de los analitos mediante muestras no incluidas en la etapa de calibración, es decir, a validar el modelo.

Desde el punto de vista de la calibración multivariante, este proceso lleva consigo la separación matemática, más que física, de los diferentes analitos presentes en una muestra, lo que hace que su tratamiento sea mínimo. Mediante su aplicación es posible obtener información cuantitativa selectiva a partir de medidas poco selectivas.

En cuanto a los métodos de calibración multivariante, existen una gran variedad de ellos sobre todo de orden uno y dos (358-361). Cabe destacar la clasificación realizada por Liang y col. (361) de los diferentes métodos dependiendo del grado de complejidad del sistema analítico. Este grado de complejidad viene determinado por el conocimiento a priori de la composición química del sistema analítico, clasificándolos en tres categorías: blancos, grises y negros. En este sentido, estudian las ventajas y limitaciones de diferentes métodos de calibración multivariante de diferentes ordenes con respecto a dicho grado de complejidad.

Desde el punto de vista de los métodos de orden uno, diferentes autores han estudiado cual de todos ellos puede considerarse como el mejor (362-364). La conclusión general de todos ellos es que debido a que los sistemas analíticos están caracterizados por multitud de factores (ruido espectral, solapamiento espectral, número de muestras y longitudes de onda incluidas en la calibración, etc.) es imposible a priori, saber cual de los métodos de calibración dará los mejores resultados (menores errores de predicción). Debido a que los sistemas analíticos tienden a ser diferentes, no hay ninguna razón para esperar que el mejor método para un determinado sistema, sea mejor para todos los demás sistemas, es decir, la elección óptima de un método de calibración depende de las condiciones experimentales particulares del sistema. Seasholtz y Kowalski (365) proponen un procedimiento para seleccionar el mejor método de calibración para un sistema dado basándose en el principio de parsimonia. Dicho principio afirma que si dos métodos modelan adecuadamente el sistema, aquel que viene descrito por un número menor de parámetros tendrá una mejor capacidad de predicción para muestras desconocidas. Este principio está relacionado con el hecho de que cuanto menor es el número de parámetros del modelo, menor será la propagación de los errores al estimar dichos parámetros a partir de los datos del sistema, minimizándose el sobreajuste ("overfitting").

Otro de los aspectos que se ha estudiado dentro de la calibración multivariante ha sido el efecto de la presencia de no linealidades o curvaturas en el sistema analítico. En este sentido, hay que destacar el estudio realizado por diferentes autores (366,367) sobre el efecto de las no linealidades, tanto en la variable dependiente como en la variable independiente o en ambas a la vez, en la aplicación de los métodos de calibración multivariante; así como, el empleo de distintas representaciones gráficas de los residuales para poner de manifiesto dichas no linealidades. Por otra parte, Sekulic y col. (368) realizan una revisión de los diversos métodos no lineales de calibración multivariante que se han creado o adaptado a partir de métodos lineales.

Una parte de la calibración multivariante que se ha desarrollado durante los últimos años ha sido la normalización instrumental tanto de orden uno como de orden dos (369-373) y que hace referencia a la posibilidad de intercambiar un modelo de calibración desarrollado en un instrumento con otros instrumentos. La calibración multivariante resuelve dicho problema de transferencia mediante una transformación matemática basada en medidas de unas determinadas muestras en ambos instrumentos, haciendo que la señal analítica medida en un instrumento sea la misma que se obtendría si se midiera en un segundo instrumento lo que evita el tener que medir de nuevo todas las muestras en este instrumento (recalibrar), sobre todo si se tiene en cuenta que los modelos de calibración multivariante se desarrollan a partir de muestras analizadas durante un amplio periodo de tiempo (en ocasiones incluso años). En general, la transferencia de un modelo de calibración no solo depende de las variables propias de los instrumentos y de las condiciones experimentales de medida sino también de la complejidad de dicho modelo.

A.7.2. Métodos de calibración multivariante.

A.7.2.a. Regresión clásica de mínimos cuadrados (CLS)

La regresión de mínimos cuadrados clásica (CLS), también conocida como método de la matriz **K** (374,375) y regresión lineal múltiple (MLR) (376,377), considera la señal analítica como una función de la concentración del analito, es decir, se asume que la señal analítica o espectro de una muestra, en el caso espectroscópico, está modelada como una combinación lineal del espectro de cada uno de los componentes que forman parte de la misma. En este sentido, este método precisa de la inclusión explícita de todas las causas de variación de la señal analítica, tanto de las concentraciones de los analitos de interés como de los posibles interferentes y otras causas de la variación de la respuesta instrumental (378). No obstante, se han propuesto varios métodos de cuantificación aplicados a este método en el caso de la presencia de interferencias en el sistema (355). La inclusión adicional de otros términos como puede ser el ruido de fondo ha permitido mejorar los límites de detección con respecto a los métodos univariantes puesto que el hecho de aumentar la información del sistema ayuda a discriminar la señal del ruido (379,380). Este ruido de fondo puede representar líneas bases no cero así como regiones de no linealidad.

Para la aplicación de este método, y en general de cualquier método de calibración multivariante, se parte de dos conjuntos de datos bien definidos representados por las matrices **A** y **C**. El primero de ellos (**A**) está formado por el conjunto de respuestas instrumentales correspondientes a **l** diferentes longitudes de onda sobre las **m** mezclas patrón. Por lo tanto, la matriz **A** tiene dimensiones de **m** × **l**, en donde cada fila corresponde al espectro de absorción de cada una de las mezclas patrón. El segundo conjunto de datos (**C**), lo constituyen el conjunto de concentraciones conocidas de los **n** analitos sobre las **m** mezclas

patrón formando una matriz de dimensiones $m \times n$ en donde las filas son las concentraciones de las soluciones patrón utilizadas durante el proceso de calibración. La relación que establece el método CLS entre estas dos matrices viene dado por el sistema de ecuaciones:

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & \cdots & a_{2n} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ a_{m1} & a_{m2} & \cdots & a_{mn} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & \cdots & c_{1n} \\ c_{21} & c_{22} & \cdots & c_{2n} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ c_{m1} & c_{m2} & \cdots & c_{mn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} k_{11} & k_{12} & \cdots & k_{1l} \\ k_{21} & k_{22} & \cdots & k_{2l} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ k_{n1} & k_{n2} & \cdots & k_{nl} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} e_{11} & e_{12} & \cdots & e_{1l} \\ e_{21} & e_{22} & \cdots & e_{2l} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ e_{m1} & e_{m2} & \cdots & e_{ml} \end{pmatrix}$$

o, alternativamente

$$A = CK + E$$

donde \mathbf{K} ($n \times l$) es la matriz de coeficientes de regresión en el modelo lineal y que en el caso espectroscópico corresponde a los espectros de los componentes de las mezclas patrón referidos a la unidad de concentración y \mathbf{E} representa los errores o residuales del modelo que se asume que están distribuidos normalmente con un valor esperado igual a cero, no correlacionados entre si y su varianza es única (homocedasticidad).

Cuando este método se aplica a sistemas con un comportamiento ideal (lineal, sin interferencias, bajo ruido, sin colinearidad, etc.) suele dar los mejores resultados debido a una correlación perfecta entre las matrices \mathbf{A} y \mathbf{C} . No obstante, la utilización de este método implica el uso de toda la información de la matriz \mathbf{A} , incluido cualquier tipo de información irrelevante o poco útil como puede ser el ruido aleatorio del sistema. Esto hace que al aplicar el método a una muestra desconocida, esta información irrelevante puede hacer que la suposición de correlación perfecta entre \mathbf{A} y \mathbf{C} no sea cierta.

A diferencia de otros métodos de calibración multivariante el CLS proporciona una mayor información química al ser la matriz **K** los espectros de los analitos y por lo tanto será el mejor método a elegir en el caso de que se trate de realizar la identificación o análisis estructural de los analitos a partir de sus espectros.

Durante el proceso de calibración se lleva a cabo el cálculo de la matriz **K**. Existen, en principio, tres métodos de obtener dicha matriz (381):

- 1.- Puesto que las columnas de la matriz **K** representan espectros de los analitos, estos se pueden obtener individualmente a partir de los analitos puros que forman el sistema, siendo por lo tanto, un método rápido y poco laborioso. Este método suele denominarse como análisis multicomponente directo (382).
- 2.- Este segundo método es más general en el sentido de que es la base de la aplicación de todos los métodos de calibración multivariante y se suele denominar como calibración indirecta (382). En este caso se lleva a cabo la resolución del sistema de ecuaciones a partir de las matrices **A** y **C** las cuales deben ser representativas del conjunto de la población. La estimación de la matriz **K** que minimiza la suma de los cuadrados de los errores de la señal analítica viene dada por la siguiente fórmula:

$$K = (C^T C)^{-1} C^T A$$

Aunque la aplicación de este segundo método para la obtención de la matriz **K** es el más extendido pues tiene en cuenta posibles interacciones entre los analitos, así como no linealidades instrumentales que pueden hacer cambiar las características de las mezclas, su utilización en ciertos sistemas puede dar en ocasiones peores resultados con respecto al primer método puesto que en su obtención el método incluye errores tanto instrumentales como de concentración

así como un posible incremento de los errores durante el proceso de la inversión de la matriz, mientras que en el primer método solo intervienen errores de tipo espectral (377).

3.- En el caso de que la mezcla desconocida contenga una interferencia o efecto matriz no identificable es posible obtener la matriz \mathbf{K} mediante el método de adición estándar generalizado (GSAM) (352,383,384). El sistema a resolver sería el mismo que en el caso anterior con la única diferencia de que en este caso la matriz \mathbf{C} representaría cantidades adicionadas a la mezcla, mientras que la matriz \mathbf{A} representaría incrementos de señal debido a las adiciones.

Una vez calculada la matriz \mathbf{K} tiene lugar la etapa de predicción que viene dada por las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \mathbf{a}_d &= \mathbf{c}_d \mathbf{K} \\ \mathbf{c}_d &= \mathbf{a}_d \mathbf{K}^T (\mathbf{K} \mathbf{K}^T)^{-1} \end{aligned}$$

donde \mathbf{a}_d es el espectro de la mezcla desconocida y \mathbf{c}_d es la estimación de la concentración de los n analitos de dicha mezcla. En este caso, los valores de \mathbf{c}_d son estimadores insesgados y de mínima varianza de los valores reales, es decir, es el mejor estimador lineal no afectado de errores sistemáticos (“unbiased”).

Como se ha comentado una de las ventajas de la calibración multivariante es la posibilidad de identificar aquellas mezclas de calibración o predicción que no pertenecen al conjunto de calibración. En este sentido se han desarrollado diferentes tests para identificar dichas mezclas cuando se utiliza este método. Entre estos tests cabe destacar el efecto leva (“leverage”), la distancia de Cook, así como una serie de parámetros estadísticos relacionados con los residuales del modelo de calibración (385,386). Normalmente, mediante el examen de los residuales espectrales se pueden identificar una gran variedad de

problemas potenciales, como desviaciones de la ley de Lambert-Beer o la presencia de analitos inesperados o interferencias. La aplicación de estimadores robustos para este método ha permitido resolver parte de este problema, puesto que, en vez de identificar aquellas mezclas que no pertenecen al conjunto para posteriormente eliminarlas, se aplica un estimador que permite que la regresión no se vea afectada por dichas mezclas o también frente al hecho de que el ruido no se distribuya normalmente (387,388).

En cuanto al número mínimo de mezclas y longitudes de onda necesarias para el cálculo de la matriz \mathbf{K} y de la concentración (c_a) respectivamente, este viene dado por el número de grados de libertad. En el caso de la regresión lineal estos grados de libertad están determinados por la diferencia entre el número de observaciones (mezclas o longitudes de onda) y la dimensión del modelo (analitos más término independiente). Puesto que el número mínimo de grados de libertad es uno, se necesitan al menos dos mezclas más que el número de analitos para calcular la matriz \mathbf{K} , mientras que, para calcular c_a , el número mínimo de longitudes de onda debe ser dos o más que el número de analitos. En el caso de no considerar el término independiente entonces el número de mezclas y longitudes de onda mínimos sería uno menos con respecto al caso anterior (389). Puesto que el número máximo de longitudes de onda para calcular c_a no está limitado, este método presenta la ventaja de poder promediar la señal analítica a lo largo de las longitudes de onda utilizadas. En este sentido este método se denomina también de espectro completo ("full-spectrum").

Por otra parte, aunque la utilización del método segundo para el cálculo de la matriz \mathbf{K} es útil para aproximar ciertas desviaciones o no linealidades y puesto que dichas desviaciones son aproximadas mediante una regresión lineal, la exactitud de los resultados finales dependerá de la magnitud de dicha desviación. En el caso de sistemas que presentan grandes desviaciones, es

conveniente la utilización de modelos no lineales (390). Así, la inclusión de términos cruzados y exponenciales en la matriz \mathbf{K} para el cálculo de \mathbf{c}_d puede mejorar los resultados, reduciendo la magnitud de los errores al modelar las posibles desviaciones debido a interacciones (391).

Una de las dificultades que pueden aparecer en este método es la presencia de un alto grado de colinearidad lo que hace que los resultados estimados sean inestables. La colinearidad viene dada cuando una o más filas o columnas de una matriz son combinación lineal de otras, y afecta principalmente al cálculo de la matriz inversa haciendo que la varianza de los coeficientes de regresión sea muy grande. No obstante, se han propuesto diferentes métodos de ortogonalización matricial para evitar este problema (392).

Cabe destacar el estudio estadístico realizado por Thomas (393) sobre este método en el que propone un nuevo estimador durante la etapa de predicción, el cual es consistente con respecto al número de observaciones utilizadas al contrario que el estimador clásico.

Cuando durante la etapa de calibración o validación se incluye información adicional sobre la varianza de los errores, entonces el método CLS recibe el nombre de método de mínimos cuadrados ponderado (WLS) y de forma más general, método de mínimos cuadrados generalizado (GLS). En el caso del CLS se considera que las varianzas de los errores son desconocidas e iguales y que los errores son independientes entre ellos. A diferencia del CLS, en el WLS y GLS se considera que ciertos residuales son más importantes que otros al calcular tanto la matriz \mathbf{K} como \mathbf{c}_d . En particular, los residuales correspondientes a errores con una mayor varianza serán tenidos menos en cuenta en el cálculo correspondiente. La diferencia entre el WLS y el GLS estriba en que el primer caso se considera que los errores a pesar de tener diferente varianza no están correlacionados por lo que la matriz de covarianza es diagonal. El método WLS

puede aplicarse tanto en la etapa de calibración como en la de predicción mientras que el GLS solo se aplica en la etapa de predicción. La estimación de la matriz \mathbf{K} y de \mathbf{c}_d viene dada por:

$$\mathbf{k}_i = (\mathbf{C}^T \mathbf{V}_i^{-1} \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T \mathbf{V}_i^{-1} \mathbf{a}_i$$

$$\mathbf{c}_d = \mathbf{a}_d \Sigma^{-1} \mathbf{K}^T (\mathbf{K} \Sigma^{-1} \mathbf{K}^T)^{-1}$$

donde \mathbf{V} ($m \times m$) y Σ ($l \times l$) son las matrices de covarianza de los residuales en calibración y predicción respectivamente, las cuales son utilizadas como factor de peso. Desde el punto de vista de la calibración, Haaland y col. (390) demuestran que la varianza de los errores es proporcional a la inversa del cuadrado de la transmitancia para cada longitud de onda y mezcla, de manera que calculan cada columna de la matriz \mathbf{K} (\mathbf{k}_i) a partir de cada columna de la matriz \mathbf{A} (\mathbf{a}_i). En cuanto a la predicción, Haaland y Easterling (394), a partir del mismo concepto anterior, calculan la matriz de covarianza (Σ) pero con la diferencia de que en este caso dicha matriz se calcula a partir de la mezcla de predicción y no a partir de las de calibración. No obstante, en el caso de la predicción, se puede también utilizar como factor de peso parámetros estadísticos obtenidos a partir de la calibración. Así, por ejemplo, la desviación estándar de cada longitud de onda calculada a partir de la etapa de calibración puede utilizarse como factor de peso durante la etapa de predicción de forma que las longitudes de onda con mayores desviaciones tendrán un menor peso que las demás (381). Igualmente el cálculo de la matriz Σ en el caso del método GLS se lleva a cabo a partir de los datos de la calibración (395). En el caso de que la matriz Σ dependa de una serie de parámetros es posible calcular dicha matriz mediante un proceso iterativo. En definitiva la utilización de estos métodos (WLS y GLS) nos permite reducir o eliminar información que sabemos a priori que es irrelevante o poco útil.

A.7.2.b. Regresión inversa de mínimos cuadrados (ILS)

La regresión de mínimos cuadrados inversa (ILS), también conocida como método de la matriz **P** (374,375,396) y regresión lineal múltiple (MLR) (360,397,398), considera, al contrario que el CLS, la concentración del analito como una función o combinación lineal de la señal analítica. En este sentido, el método ILS tiene en cuenta los posibles errores en la medida de las concentraciones de referencia durante la etapa de calibración.

El hecho de que tanto el CLS como el ILS se denominen indistintamente como MLR se debe a que el desarrollo matemático para resolver dichos métodos sea el mismo. Pero el hecho de poner la señal analítica en función de la concentración o viceversa conlleva asumir una serie de diferencias tales como distribuciones estadísticas o algunos tipos de errores (399). En este sentido, el ILS presenta la ventaja de que los análisis basados en este modelo no varían con respecto al número de analitos incluidos en el modelo.

Por otra parte, este método precisa de una selección óptima de las señales analíticas a utilizar o de un número grande de mezclas patrón puesto que durante la etapa de calibración el número de dichas señales analíticas no puede ser nunca superior al número de mezclas patrón, por lo que presenta la desventaja de no poder promediar la señal analítica a lo largo de todo el rango disponible al considerar únicamente un número determinado de las mismas.

Partiendo de las matrices **A** y **C** definidas en el apartado anterior, la relación que establece este método viene dada por:

$$C=AP+E$$

donde **P** ($k \times n$) es la matriz de los coeficientes de regresión del modelo y **E**, al igual que antes, representa los errores del modelo o residuales.

Mientras que en el CLS la matriz **K** representaba los espectros unitarios de los analitos en este caso la matriz **P** no tiene ningún significado desde el punto espectral de los analitos. No obstante, dichas matrices están interrelacionadas puesto que la matriz **P** es la pseudoinversa de la matriz **K** y viceversa. Por lo tanto, a partir de los valores de la matriz **P** se puede deducir que cuanto mayor es el valor correspondiente a una determinada longitud de onda, menor es la sensibilidad a dicha longitud de onda para un determinado analito.

Puesto que la matriz **P** no representa los espectros unitarios de los analitos, la única forma de obtener dicha matriz durante la etapa de calibración es a través de una serie de mezclas patrón, es decir, mediante el método indirecto. La estimación de **P** que minimiza la suma de los cuadrados de los errores en la concentración viene dada por:

$$P=(A^T A)^{-1} A^T C$$

Mediante esta ecuación este método puede modelar relaciones no lineales entre la concentración y las señales analíticas siempre y cuando estas no sean muy predominantes en el sistema. En caso contrario, es posible incluir términos exponenciales o cruzados teniendo en cuenta que el número de mezclas patrón debe ser siempre igual o superior al número de términos incluidos en el modelo (400). A pesar de que no se introducen errores sistemáticos, la utilización de un número determinado de señales analíticas hace que la estimación de **P** venga dada por una gran varianza.

Durante la etapa de predicción la concentración de cada analito en las mezclas desconocidas vendría dada por:

$$c_d = a_d P$$

donde \mathbf{a}_d y \mathbf{c}_d serían el espectro y la concentración estimada de los analitos en la mezcla desconocida respectivamente.

Al igual que el CLS y desde el punto de vista matemático, el ILS está sometido a los mismos problemas derivados de la inversión de matrices. No obstante, es posible utilizar métodos de ortogonalización para evitar dicho problema (401). Como el CLS, el ILS utiliza toda la información contenida en la matriz \mathbf{A} incluida aquella que es poco relevante o inútil. En este sentido, puesto que el número de señales analíticas viene limitado por el número de mezclas patrón utilizadas en la calibración, es necesario, como se ha comentado anteriormente, seleccionar aquellas señales que presenten una mayor información del sistema, por lo que se han propuesto diferentes métodos para seleccionar dichas señales (160,362,402-404). El hecho que las señales seleccionadas no sean las óptimas o el número de las mismas no sea el apropiado, hace que la incidencia de los errores de predicción pueden incrementarse debido a factores tales como colinearidad, sobreajuste o modelado inadecuado de las interferencias o de la línea base presente en las mezclas (405).

Relacionado con el método ILS está el método denominado mejor estimador lineal (BLP), el cual está basado en minimizar el cuadrado de los residuales de la concentración pero manteniendo la precisión media lo mejor posible para la concentración estimada. En este sentido, es fácil demostrar que el BLP da resultados iguales al ILS en determinadas circunstancias (399). Lo importante es que este método BLP representa un punto de unión entre la calibración inversa y la clásica, concretamente a través del método GLS. Puesto que la concentración estimada en la etapa de predicción vendría dada por:

$$\mathbf{c}_d = \bar{\mathbf{c}} + (\mathbf{a}_d - \bar{\mathbf{c}}\mathbf{K})(\mathbf{K}^T\mathbf{D}\mathbf{K} + \mathbf{S})^{-1}\mathbf{K}^T\mathbf{D}$$

donde \bar{c} es la concentración media de cada analito en las mezclas de calibración, \mathbf{D} ($n \times n$) es la matriz de covarianza de la matriz \mathbf{C} de calibración y \mathbf{K} y Σ tienen el mismo significado que en el CLS y GLS. La inclusión de \mathbf{K} y Σ en este caso hace que exista una relación directa entre la concentración estimada a través del GLS y la estimada a través del BLP. Dicha relación vendría dada por:

$$c_{\text{BLP}} - \bar{c} = (c_{\text{GLS}} - \bar{c})(\mathbf{D}^{-1} + \mathbf{K}\Sigma^{-1}\mathbf{K}^T)^{-1}\mathbf{K}\Sigma^{-1}\mathbf{K}^T$$

o, alternativamente

$$c_{\text{GLS}} - \bar{c} = (c_{\text{BLP}} - \bar{c})(\mathbf{I} + (\mathbf{D}\mathbf{K}\Sigma^{-1}\mathbf{K}^T)^{-1})$$

donde \mathbf{I} es la matriz identidad. En el caso particular de que las varianzas (diagonal principal) de la matriz Σ sean pequeñas ambos estimadores son indistinguibles, en otras palabras, cuando la calibración es buena (representativa de la población), la diferencia entre ambos estimadores es muy pequeña.

Desde el punto de vista estadístico y teniendo en cuenta el error cuadrático medio, se demuestra que el método BLP es superior que el GLS dentro de una región elipsoidal centrada en la media de la concentración (\bar{c}) mientras que fuera de dicha región ocurre lo contrario (406). En consecuencia el método BLP, y por lo tanto la regresión inversa, dará los mejores resultados para mezclas cercanas al centro de la población, mientras que el GLS o la regresión clásica dará los mejores resultados para mezclas alejadas de dicho centro.

A.7.2.c. Filtro de Kalman (KF)

El filtro de Kalman (KF) se define como un filtro digital lineal que utiliza un algoritmo iterativo de mínimos cuadrados y está matemáticamente representado como una proyección en un espacio probabilístico lineal (espacio Gaussiano). Fue propuesto por Kalman a principios de los años sesenta (407) y ha sido aplicado a un gran número de problemas químicos y de ingeniería. Su aplicación en química analítica ha sido objeto de diferentes revisiones bibliográficas a lo largo de la última década (408-411), y aunque tradicionalmente el KF no ha sido considerado como un método de calibración multivariante, su relación, así como las similitudes y diferencias con los métodos de regresión multivariante en el análisis cuantitativo han sido estudiados por varios autores (412,413).

El KF viene definido mediante dos ecuaciones fundamentales. La primera de ellas se refiere a la dinámica o modelo del sistema, la cual describe como los parámetros o estados del sistema, representados por un vector de estado, varían con una o más variables independientes a medida que el filtro va progresando:

$$\mathbf{x}(k) = \mathbf{F}(k, k-1)\mathbf{x}(k-1) + \mathbf{w}(k)$$

La segunda ecuación se refiere al proceso de medida y describe como las señales analíticas están relacionadas con el vector de estado:

$$z(k) = \mathbf{h}^T(k)\mathbf{x}(k) + v(k)$$

En el caso particular del análisis multicomponente, el vector de estado vendría definido por la concentración de los analitos de la mezcla ($\mathbf{c}(k)$) y la matriz de transición del sistema ($\mathbf{F}(k,j)$) correspondería a la matriz identidad, puesto que la concentración es invariable a lo largo del proceso iterativo, o lo que es lo mismo, es independiente de la variable a la cual se obtiene la señal analítica. En este caso, al igual que en la mayoría de los sistemas analíticos, se

dice que el vector de estado es estático mientras que si dicha matriz es diferente a la matriz identidad, se dice que el vector de estado es dinámico. Considerando la espectrofotometría de absorción molecular, $z(k)$ sería el valor de la señal analítica (absorbancia) de la mezcla a cada una de las longitudes de onda ($a(k)$), el vector $\mathbf{h}^T(k)$ correspondería al espectro de cada uno de los analitos de la mezcla ($\mathbf{k}^T(k)$), y el índice k indicaría que el proceso iterativo se realiza a lo largo de un intervalo de longitudes de onda. En definitiva, la ecuación que representa el proceso de medida no es más que la forma clásica de la ley de Lambert-Beer, es decir,

$$a(k) = \mathbf{k}^T(k)\mathbf{c}(k) + v(k)$$

Por otra parte, el algoritmo del KF viene dado por una serie de ecuaciones para calcular tanto el vector de estado como su matriz de covarianza. Todas estas ecuaciones vienen expresadas como:

- Extrapolación del vector de estado:

$$\mathbf{c}(k/k-1) = \mathbf{F}(k, k-1)\mathbf{c}(k-1/k-1)$$

- Extrapolación de la matriz de covarianza:

$$\mathbf{P}(k/k-1) = \mathbf{F}(k, k-1)\mathbf{P}(k-1/k-1) + \mathbf{Q}(k)$$

- Factor de ganancia:

$$\mathbf{g}(k) = \mathbf{P}(k/k-1)\mathbf{k}(k) [\mathbf{k}^T(k)\mathbf{P}(k/k-1)\mathbf{k}(k) + \mathbf{R}(k)]^{-1}$$

- Actualización del vector de estado:

$$\mathbf{c}(k/k) = \mathbf{c}(k/k-1) + \mathbf{g}(k) [a(k) - \mathbf{k}^T(k)\mathbf{c}(k/k-1)]$$

- Actualización de la matriz de covarianza:

$$\mathbf{P}(k/k) = [\mathbf{I} - \mathbf{g}(k)\mathbf{k}^T(k)]\mathbf{P}(k/k-1)$$

donde:

n	número de parámetros del vector de estado.
k	índice que indica el número de la medida (iteración).
$\mathbf{c}(k)$	vector de estado (concentración de cada componente) ($n \times 1$).
$\mathbf{F}(k,j)$	matriz de transición del sistema ($n \times n$).
$\mathbf{w}(k)$	ruido del modelo del sistema ($n \times 1$).
$\mathbf{Q}(k)$	matriz de covarianza del ruido del modelo del sistema ($n \times n$).
$a(k)$	señal analítica.
$\mathbf{k}^T(k)$	vector función de medida ($1 \times n$). Relación entre la señal analítica y el vector de estado (espectro de cada componente).
$v(k)$	ruido del proceso de medida.
$R(k)$	varianza del ruido del proceso de medida.
$\mathbf{P}(k/j)$	matriz de covarianza del vector de estado ($n \times n$).
$\mathbf{g}(k)$	factor de ganancia del KF ($n \times 1$).
\mathbf{I}	matriz identidad ($n \times n$).

La notación ($k/k-1$) indica la estimación en el punto k basada en medidas obtenidas hasta el punto $k-1$.

Las dos primeras ecuaciones de extrapolación del algoritmo describen la propagación del vector de estado y de su matriz de covarianza a lo largo del proceso. El factor de ganancia es esencialmente un factor de peso para la siguiente iteración, dando una estimación de cuanta información ha sido añadida por la correspondiente medida en dicha iteración y siendo inversamente proporcional a la varianza del ruido del proceso de medida. En una situación ideal, este factor de ganancia debería converger hacia un valor de cero a medida

que el vector de estado se va estabilizando a lo largo del proceso iterativo, pero en la práctica converge en un intervalo alrededor de cero determinado por el ruido del sistema. Las dos últimas ecuaciones del algoritmo corresponden a la actualización, tanto del vector de estado, como de su matriz de covarianza. En el caso de la actualización del vector de estado, este depende de una cantidad conocida como **innovación** que viene definido como:

$$v(k) = a(k) - \mathbf{k}^T(k)\mathbf{c}(k/k-1)$$

Como se puede observar, la **innovación** es la diferencia entre las medidas predichas por el vector de estado en cada una de las iteraciones y la medida observada, siendo por lo tanto, un residual que, al ser calculado en cada una de las iteraciones, es conocido como residual “on-line”. Esta **innovación** difiere de los residuales calculados mediante un procedimiento de mínimos cuadrados clásico, en que estos últimos están basados en las estimaciones finales de los parámetros del modelo. La serie de valores de $v(k)$ es conocida como **secuencia de innovaciones**.

Para poder aplicar este algoritmo es necesario definir previamente $\mathbf{F}(k,j)$ y $\mathbf{k}^T(k)$, así como dar una estimación de $\mathbf{Q}(k)$ y $\mathbf{R}(k)$, mientras que se asume que tanto la contribución del ruido del sistema ($\mathbf{w}(k)$) como del proceso de medida ($v(k)$) se distribuyen normalmente con media cero y sus correspondientes varianzas. En el caso del análisis multicomponente, debido a la invariabilidad del vector de estado (concentración), la matriz de covarianza del ruido del sistema se considera cero ($\mathbf{Q}(k) = 0$).

Puesto que el método es aplicado de forma recursiva, es necesario dar un valor inicial $\mathbf{c}(k)$ y $\mathbf{P}(k/j)$. Los resultados finales no dependen de estos valores iniciales, siempre y cuando los valores de la diagonal principal de $\mathbf{P}(k/j)$ sean lo

suficientemente grandes como para prevenir que la estimación final de $\mathbf{c}(k)$ no venga afectada por dicha aproximación inicial. El hecho de dar un valor arbitrario inicialmente hace que la estimación de $\mathbf{c}(k)$ no sea exacta hasta que el filtro ha avanzado a lo largo de algunas iteraciones. El caso particular del análisis multi-componente, la aproximación inicial de $\mathbf{c}(k)$ suele ser cero mientras que $\mathbf{P}(k/j)$ se toma como una matriz diagonal con valores grandes respecto a $\mathbf{R}(k)$, que se suele considerar constante a lo largo del proceso iterativo e igual a la varianza de la medida. En este sentido Liu y col. (414) han demostrado que cuanto mayor es $\mathbf{P}(k/j)$, más rápida es la convergencia de $\mathbf{c}(k)$ hacia su valor verdadero, mientras que cuanto mayor es $\mathbf{R}(k)$, la convergencia es más lenta. Por otra parte, la raíz cuadrada de $\mathbf{P}(k/j)$ suele considerarse como la desviación estándar de $\mathbf{c}(k)$ en cada iteración.

Al estar basado el KF en la forma clásica de la ley de Lambert-Beer, el cálculo de $\mathbf{k}^T(k)$ durante el proceso de calibración puede hacerse, al igual que en el CLS, de forma directa, a partir de patrones puros, o multivariantemente. En cuanto a la forma multivariante se han desarrollado igualmente algoritmos de KF para el cálculo de $\mathbf{k}^T(k)$ ya sea a partir de mezclas patrón (159,412) o aplicando un método GSAM (415). En el caso de que el ruido de fondo contribuya a la respuesta del sistema y además sea reproducible, es posible incluirlo en $\mathbf{k}^T(k)$. En caso contrario la utilización conjunta del KF con técnicas derivadas permite su reducción o eliminación del sistema (318).

El KF presenta una serie de ventajas con respecto a los métodos tradicionales de regresión de mínimos cuadrados. Desde el punto de vista matemático, la ventaja más evidente es que el KF no requiere hacer inversión de matrices debido a su naturaleza iterativa, lo que mejora la estabilidad numérica en el cálculo del vector de estado. No obstante, es necesario realizar los cálculos con gran precisión a lo largo del proceso iterativo, puesto que sino el error de

redondeo será propagado y amplificado en cada una de las iteraciones. La manifestación más común de este tipo de error se da cuando los elementos de la diagonal principal de $P(k/j)$ toman valores negativos lo cual de acuerdo con la teoría es imposible. Esto ocurre cuando en la aproximación inicial de $P(k/j)$ se toman valores demasiados grandes y el valor de $R(k)$ es muy pequeño (411). Una solución a este problema ha sido la utilización de ecuaciones que establezcan numéricamente la actualización de esta matriz a lo largo del proceso iterativo. En este sentido se han propuesto dos ecuaciones:

$$P(k/k) = P(k/k-1) - P(k/k-1)k(k)g^T(k) + g(k)g^T(k)$$

o, alternativamente

$$P(k/k) = [I - g(k)k^T(k)]P(k/k-1)[I - g(k)k^T(k)]^T + g(k)R(k)g^T(k)$$

No obstante, cuando se utiliza doble precisión en los cálculos numéricos, no se dan diferencias importantes en la estimación de $c(k)$ utilizando una u otra ecuación (414). Otras aproximaciones que producen un algoritmo más estable están basados en la factorización de $P(k/j)$ (411).

Debido a su flexibilidad, el KF es capaz de hacer frente a los errores debidos tanto a la presencia de interferencias, como a datos que no pertenecen al conjunto, para ello se utilizan diferentes modificaciones del algoritmo clásico. Entre estas modificaciones la más utilizada es la que da lugar al denominado filtro de Kalman adaptado (AKF) (416) el cual fue introducido por Rutan y Brown, quienes demostraron que en ciertos casos la corrección de dichos errores puede llevarse a cabo a través de la **secuencia de innovaciones**. En el caso de que el modelo fuera inexacto la **innovación**, que por ser un residual debería distribuirse aleatoriamente, aumenta en determinadas iteraciones, lo

que afecta a la estimación de $\mathbf{c}(k)$. En este sentido el AKF lo que hace es adaptar, a lo largo del proceso iterativo, el valor de $R(k)$ a dichos errores del modelo a través de la **innovación**, es decir, si la **innovación** indica que determinadas medidas vienen afectadas por un error, entonces $R(k)$ es recalculado para reflejar la magnitud de dicho error. Dicha adaptación vendría dada por la siguiente ecuación:

$$R(k) = \frac{1}{m} \left[\sum_{p=1}^m v(k-p)v(k-p) \right] - \mathbf{k}^T(k) \mathbf{P}(k/k-1) \mathbf{k}(k)$$

donde m es el intervalo a lo largo del cual se realiza la nueva estimación de $R(k)$. Puesto que $R(k)$ es directamente proporcional a $v(k)$, al aumentar $v(k)$, aumenta $R(k)$, lo cual se traduce en una disminución de $\mathbf{g}(k)$ y por lo tanto un menor peso de dichas medidas en la estimación de $\mathbf{c}(k)$, lo que le confiere un mayor carácter de método ponderado. No obstante, este método presenta la limitación de que el modelo debe ser válido para ciertos valores de la señal analítica. Por otra parte, aunque es capaz de estimar la concentración teniendo en cuenta la posible contribución de las interferencias, este método hace incrementar la varianza de dichas estimaciones y es generalmente ineficaz para modelos no lineales. Un problema que presenta este método es que es sensible a los valores iniciales tomados para $\mathbf{c}(k)$ y $\mathbf{P}(k/j)$, por lo que es necesario optimizar previamente dichos valores para obtener buenos resultados (417,418).

A.7.2.d. Regresión de componentes principales (PCR) y regresión parcial de mínimos cuadrados (PLS)

La regresión de componentes principales (PCR), introducida a mediados de los años sesenta, y la regresión parcial de mínimos cuadrados (PLS), introducida a mediados de los años setenta, son conocidas igualmente como métodos blandos en comparación con los métodos tradicionales de mínimos cuadrados que se consideran modelos duros, y como métodos bilineales (BLM). Ambos métodos son tratados conjuntamente puesto que parten del mismo concepto, la descomposición de la matriz de calibración en el producto de dos conjuntos de parámetros lineales denominados “scores” y “loadings”. Desde el punto de vista físico estos métodos no parten de una ley determinística, sino empírica; mientras que desde el punto de vista estadístico los errores asociados al modelo no tienen porque seguir una determinada distribución. Por lo tanto, estos métodos requieren muy poco conocimiento sobre las relaciones causales entre los parámetros y las variables del modelo, es decir, no hace falta conocer cuales son las causas de variación reales y modelarlas explícitamente ya que se obtienen de forma abstracta a partir del análisis matemático de factores de los datos de calibración.

Mediante la aplicación de estos métodos se intenta expresar toda la información significativa contenida en los datos de calibración en un número reducido de nuevas variables llamados factores, variables latentes o componentes principales, no colineales entre si (ortogonales) y linealmente independientes (no correlacionados) entre ellos, que son combinación lineal de las variables originales.

Estos componentes principales son calculados de tal modo que el primero de ellos lleve asociado el mayor porcentaje de la varianza, disminuyendo dicho porcentaje hasta el último de ellos. A pesar de que el número total de compo-

nentes extraídos puede ser igual al número de variables originales, únicamente los primeros llevarán asociada una varianza acumulada significativa.

Las ecuaciones que definen la etapa de calibración, la cual se lleva a cabo de forma indirecta, vienen dadas por:

$$A = TP + E$$

$$C = TQ + F$$

$$T = AV$$

donde las matrices **A** y **C** representan, respectivamente, las señales analíticas correspondientes a una serie de mezclas patrón y sus concentraciones para cada analito en dichas mezclas. **P** expresa el nuevo sistema de coordenadas sobre el que se reproduce o descompone la información de la matriz **A** (matriz de “loadings”). **T** es la matriz de “scores” o intensidades en este nuevo sistema de coordenadas. Como demuestran Lorber y col. (419) los vectores “scores y loadings” calculados mediante PLS son combinaciones lineales de los calculados mediante PCR. **Q** es la matriz de coeficientes de regresión que relaciona **T** con las concentraciones de los analitos en cada una de las mezclas patrón (**C**). En el caso espectrofotométrico la matriz **P** contiene los vectores “loading” que son una combinación lineal de los espectros puros de los componentes mientras que la matriz **T** representa, en este nuevo espacio vectorial, la cantidad de cada vector “loading” que se debe incluir en la reproducción de cada espectro experimental. Los residuales **E** y **F** representan la variación de **A** y **C** no explicada por el factor correspondiente. La matriz **V** es definida o estimada en función del criterio de optimización que caracteriza a los diferentes métodos de calibración. Para el PCR la matriz **V** es estimada únicamente a partir de la matriz **A** mediante un análisis de componentes principales (PCA) (420), mientras que en el PLS dicha matriz es estimada utilizando conjuntamente la información de **A** y **C** siendo esta la principal diferencia entre ambos métodos. Una vez establecido

dicho criterio y estimada la matriz V se determina la matriz T a partir de la cual las matrices P y Q son estimadas mediante regresión lineal múltiple de las matrices A y C sobre la matriz T , es decir:

$$P=(T^T T)^{-1} T^T A$$

$$Q=(T^T T)^{-1} T^T C$$

Una vez determinadas las matrices P y Q tiene lugar la etapa de predicción que viene definida por las siguientes ecuaciones:

$$a_d = t_d P$$

$$c_d = t_d Q$$

En esta etapa se calcula primero el vector de “scores” (t_d) correspondiente al vector de señales analíticas (a_d) de la muestra desconocida, mediante proyección de este sobre el nuevo espacio vectorial definido por la matriz P . Una vez determinado t_d se proyecta este sobre la matriz Q , correspondiente a las concentraciones de los analitos, obteniéndose finalmente la concentración de los analitos en la mezcla problema.

El hecho de utilizar únicamente una parte o la información más relevante de la matriz A , hace que las estimaciones de c_d estén afectadas por un cierto error sistemático, a diferencia de los métodos tradicionales de mínimos cuadrados.

Estos métodos intentan optimizar el modelo con respecto a su poder de predicción mediante la descomposición de la matriz A en una serie de factores. Esta optimización está basada en equilibrar dos parámetros estadísticos que contribuyen al error de predicción y que están relacionados con el proceso de calibración. Estos parámetros estadísticos son el error sistemático de predicción

(“bias”) y la varianza de los variables estimadas (concentración), los cuales están inversamente relacionados. Al aumentar la complejidad del modelo (mayor número de factores) los errores sistemáticos van disminuyendo, puesto que el modelo es capaz de modelar de forma más adecuada aquellos fenómenos que intervienen en el sistema (interferencias físicas y químicas). Sin embargo, este aumento de la complejidad hace que la varianza aumente debido a la inclusión de incertidumbres o medidas aleatorias presentes en los datos de calibración, lo que es conocido como sobreajuste. En este sentido, un modelo es sobreajustado si incluye información irrelevante o aleatoria en el modelo durante la etapa de calibración tal como el ruido del sistema, en cuyo caso dicho modelo podrá dar errores de predicción grandes. El equilibrio de ambos parámetros estadísticos depende de la naturaleza de las mezclas, así como de la precisión de los datos de calibración.

En cuanto a los algoritmos utilizados para descomponer la matriz A en sus correspondientes “loadings” y “scores” los más populares en el caso del PCR son el algoritmo NIPALS y la descomposición en valores singulares (SVD), siendo las propiedades numéricas de este último superiores al primero. En cuanto al PLS la descomposición más utilizada es la denominada PLS1, la cual ha sido estudiada por diferentes autores (358,419,421-424). Otro algoritmo del PLS es el denominado PLS2 que se diferencia del PLS1 en el hecho de que estima la concentración de cada analito simultáneamente, a diferencia del PLS1 que lo hace de forma individual. El PLS2 es útil en el caso de que los diferentes analitos de la mezcla estén fuertemente intercorrelacionados, mientras que en el caso de la presencia de no linealidades, la utilización del PLS1 presenta ciertas ventajas sobre el PLS2. Por otra parte, si los errores del modelo son independientes entre ellos y tienen aproximadamente la misma varianza, el PLS2 dará mejores resultados que el PLS1. En caso contrario la aplicación del PLS2 puede ser contraproducente y se debe utilizar una serie de algoritmos PLS1 indepen-

dientes para cada uno de los analitos. Diferentes aspectos relacionados con este algoritmo pueden encontrarse en los trabajos de Manne (424) y Hoskuldsson (422).

Matemáticamente estos métodos pueden ser considerados como intermedios entre el CLS y el ILS. A diferencia del CLS los parámetros estimados en la etapa de calibración no representan realidades físicas o químicas específicas, mientras que estos métodos describen y compensan los problemas de selectividad en contraste con el ILS que únicamente los compensa pero no los describe. No obstante, puesto que la matriz de concentración (C) es modelada en función de los parámetros obtenidos de la descomposición de la matriz de señales analíticas (A), estos métodos son considerados como métodos inversos. Como consecuencia, y al igual que el ILS, estos métodos permiten estimar la concentración de los analitos de interés aun en presencia de causas de variación no explícitas en la formulación del modelo (interferencias). En este caso en las ecuaciones anteriores se sustituiría la matriz C por el vector de concentración correspondiente al analito de interés. Por otra parte, al igual que el CLS ambos métodos son de espectro completo lo que, en principio, les confiere una mayor precisión en las estimaciones realizadas. Una ventaja que presentan estos métodos sobre el CLS y el ILS es que no presentan problemas derivados de la inversión de matrices (colinealidad) puesto que las matrices obtenidas en la descomposición de la matriz A son ortogonales.

El problema esencial en estos métodos se encuentra en la elección adecuada del número de factores o variables latentes que se deben incluir en el modelo y que deberá ser inferior al número de variables originales (mezclas o señales analíticas) de la matriz A . En el caso de que dicho número de factores fuera igual al rango de la matriz A , el resultado obtenido por cualquiera de ambos métodos sería igual al obtenido mediante ILS, es decir, al aumentar el número de factores ambos métodos convergen hacia el ILS. El número de

factores retenidos en el modelo es denominado como el pseudorango de la matriz de calibración. La selección de este pseudorango es importante porque el modelo debe describir la fuentes de variación significativas, pero no sobreajustar los datos. El número de factores (factores primarios) retenidos en el modelo está relacionado, desde el punto de vista químico, con el número de causas reales o fuentes de variación sistemática de la matriz de calibración (**A**), como pueden ser el número de analitos presentes en las mezclas, interacciones entre ellos así como variables físicas y químicas que actúen sobre el sistema analítico. En la determinación correcta de dicho número se han propuesto la utilización de diversos métodos (425,426) entre los cuales el más utilizado es el denominado validación de cruce ("cross-validation") (427-430) el cual selecciona dichos factores a través de los errores de predicción obtenidos al estimar los propios datos de calibración (**C**). En este sentido, una o varias mezclas de calibración son excluidas de la etapa de calibración y su concentración estimada a partir del resto de las mezclas que se utilizan para obtener el modelo. Este procedimiento se repite tantas veces como sea necesario hasta que todas las mezclas de calibración han sido excluidas una única vez y su concentración estimada con el resto de las mezclas. Al final del proceso la suma de los cuadrados de los errores de predicción (PRESS) es utilizada junto con una serie de test estadísticos para seleccionar dicho número de factores.

En general, los factores seleccionados contienen la mayor información o varianza del sistema analítico mientras que aquellos factores (factores secundarios) que representan el ruido son eliminados y no considerados durante el proceso de calibración o modelado. En otras palabras, mediante la selección de los factores adecuados se pretende incluir en el modelo aquellos factores que presenta una gran varianza de la matriz **A** (PCR) o covarianza entre las matrices **A** y **C** (PLS).

Aunque la capacidad de predicción de ambos métodos es generalmente la misma, el PLS puede tener, en determinados sistemas, una capacidad de predicción superior al PCR debido a la inclusión de la matriz **C** durante la etapa de calibración, lo que hace equilibrar la información contenida en ambas matrices (**A** y **C**) y reducir el impacto de variaciones grandes pero irrelevantes en la matriz **A**. La inclusión de la matriz **C** hace que normalmente el PLS necesite un número menor de factores con respecto al PCR para modelar el sistema analítico, lo que hace que dicho método sea más parsimonioso. Por otra parte, De Jong (431) demuestra que el coeficiente de determinación obtenido a partir del PLS es igual o superior al obtenido mediante el PCR para un mismo número de factores, lo que significa que el PLS ajusta los datos igual o mejor con respecto al PCR; pero esto no implica necesariamente que sea superior en cuanto a su capacidad de predicción. Por lo tanto, la elección entre PCR y PLS, cuando se ha elegido correctamente el número de factores, no es posible a partir de criterios de mejor ajuste.

Como en todos los métodos de calibración multivariante, estos métodos validan el modelo obtenido en la etapa de calibración a través de una serie de mezclas no incluidas en dicha etapa. Este tipo de validación es conocida como validación externa. Pero en el caso de estos métodos, existe otro tipo de validación conocida como validación interna, la cual se lleva a cabo utilizando las propias mezclas de calibración mediante la validación de cruce; es decir, la validación de cruce no solo se utiliza para seleccionar el número adecuado de factores que se deben incluir en el modelo sino también para validar dicho modelo.

Puesto que la inclusión de información irrelevante en el modelo puede hacer que este pierda capacidad de predicción, uno de los pasos previos que generalmente suele realizarse para eliminar este efecto y obtener modelos más parsimoniosos y robustos es el tratamiento previo de los datos. Mientras que los

métodos tradicionales de mínimos cuadrados son invariantes frente a transformaciones lineales de los datos, no ocurre lo mismo en el caso del PCR y PLS. Dentro del tratamiento previo de los datos, los más utilizados son el centrado y estandarizado de los mismos, aunque también se utilizan otros procedimientos como son el filtrado (transformada de Fourier) o la corrección multiplicativa de la señal (MSC). En el caso del PLS se ha demostrado que la exactitud de los resultados depende críticamente del factor de escala de la matriz de concentración en el caso de que ciertos componentes presenten una señal analítica muy pequeña con respecto al resto de los componentes del sistema (432). En términos de la relación entre los errores de predicción y la complejidad del modelo, el tratamiento previo de los datos lleva consigo una pronunciada reducción del error sistemático al incluir menos factores en el modelo, pero esto viene acompañado de un cierto incremento de la varianza debido a los errores de estimación (433). Seasholtz y Kowalski (434) demuestran que en determinados casos, el hecho de centrar los datos, aunque suele dar una mayor estabilidad numérica en los cálculos, puede dar lugar a errores de predicción mayores con respecto a la utilización de los datos originales, ya que el hecho de centrar los datos hace incrementar el número de términos que contribuyen a dicho error de predicción. Otro estudio realizado por Lorber y col. (435) ha demostrado que el hecho de utilizar un número determinado de mezclas de calibración, cercanas de la mezcla de predicción, para llevar a cabo el proceso de centrado (centrado local) hace mejorar el error de predicción en una media de un 20%.

Puesto que tanto el PCR como el PLS se encuadran dentro de los métodos de calibración de orden uno, la presencia de interferencias químicas no tenidas en cuenta en la etapa de calibración da lugar a resultados erróneos debido a la influencia de dichas interferencias. En este caso se han propuesto varios métodos para resolver este problema entre los cuales destaca la utilización de un método GSAM junto con el PLS (354) que incluso permite obtener resultados más

exactos con respecto al método GSAM utilizando métodos tradicionales de mínimos cuadrados debido a la capacidad del PLS de eliminar información irrelevante del sistema.

En resumen podemos decir que el hecho de que tanto el PCR como el PLS presenten un mejor comportamiento en diferentes áreas de la ciencia y la tecnología con respecto a los métodos tradicionales de mínimos cuadrados, se debe a que sus presunciones, en cuanto a las características de los diferentes sistemas, son más realistas.

A.7.2.e. Otros métodos

Además de los métodos comentados en los apartados anteriores, existen una serie de métodos que, aunque menos utilizados, no dejan de ser importantes en cuanto que han contribuido al desarrollo de la calibración multivariante.

Entre estos métodos uno de los más estudiados desde el punto de vista matemático ha sido la regresión “ridge” (RR). La RR (436-438) fue introducida a principios de los años setenta, con el propósito de estabilizar las estimaciones de las variables en el caso de que la matriz de calibración presentara una gran colinealidad. En este sentido, el RR es similar al PCR y al PLS.

En cuanto al análisis multicomponente, la estimación de la concentración en la etapa de calibración mediante este método, viene dada por:

$$\mathbf{c}_d = \mathbf{a}_d \mathbf{K}^T (\mathbf{K} \mathbf{K}^T + k \mathbf{I})^{-1}$$

donde \mathbf{c}_d , \mathbf{a}_d y \mathbf{K} tienen el mismo significado que el método CLS mientras que k es el parámetro “ridge” ($0 < k < \infty$) e \mathbf{I} es la matriz identidad. Se puede observar que esta ecuación es similar a la del método CLS excepto por el término $k\mathbf{I}$,

dando por lo tanto los mismos resultados que el CLS cuando $k=0$. Puesto que en el caso de la presencia de colinearidades en la matriz \mathbf{K} , su correspondiente matriz de correlación ($\mathbf{K}\mathbf{K}^T$) es singular, este método adiciona una matriz diagonal para resolver dicho problema y estabilizar el proceso de inversión matricial, haciendo que la estimación de \mathbf{c}_d sea igualmente más estable.

Este método plantea el problema de la selección adecuada del parámetro k puesto que su valor óptimo depende de \mathbf{c}_d y su correspondiente varianza, ya que desde el punto de vista de la predicción este parámetro debe ser elegido de manera que minimice el valor del PRESS. Puesto que \mathbf{c}_d y su varianza suelen ser desconocidas de antemano la determinación del parámetro k debe llevarse a cabo a partir de los datos experimentales de calibración haciendo que la estimación de \mathbf{c}_d sea compleja. Por otra parte, se ha demostrado que el valor de k está relacionado con la relación señal/ruido y el número de mezclas de calibración. Hoerl y Kennard (436) sugieren que la elección adecuada de k debe realizarse de forma iterativa, representando su valor frente a la estimación de las variables seleccionando aquel valor a partir del cual la estimación alcanza un valor estable.

Otro método, es el conocido como método de la matriz \mathbf{Q} (439,440) el cual omite la etapa de calibración y utiliza la matriz de señales analíticas (\mathbf{A}) directamente para ajustar la señal analítica de la muestra desconocida o de predicción (\mathbf{a}_d). En este caso, la señal analítica es ajustada como combinación lineal de las mezclas de calibración:

$$\mathbf{a}_d = \mathbf{q}\mathbf{A}$$

La solución de mínimos cuadrados de \mathbf{q} viene dada por:

$$\mathbf{q} = \mathbf{a}_d \mathbf{A}^T (\mathbf{A} \mathbf{A}^T)^{-1}$$

El vector \mathbf{q} se relaciona con la concentración de cada componente de la mezcla desconocida (\mathbf{c}_d) a través de la matriz de concentraciones de las mezclas de calibración (\mathbf{C}):

$$\mathbf{c}_d = \mathbf{q}\mathbf{C}$$

En este caso, en contraste con el ILS, el número de señales analíticas debe ser mayor o igual que el número de mezclas de calibración, siendo conveniente utilizar tantas señales analíticas como sea posible. Este método permite incluir la señal analítica correspondiente a la línea base como una mezcla de calibración más dentro de la matriz \mathbf{A} , considerando como cero la concentración de cada uno de los componentes dentro de la matriz \mathbf{C} .

La regresión en variables latentes (LRR) (349,441) es un método que está relacionado con el PCR. La diferencia entre ambos métodos está en que el LRR se basa en descomponer o proyectar la matriz de calibración utilizando los vectores latentes de la matriz de correlación obtenida a partir de las variables de respuesta (señales analíticas) y de concentración de calibración, mientras que el PCR solo utiliza la matriz de señales analíticas. Los vectores latentes que no presentan un grado de correlación con el vector de concentración son eliminados. El hecho de utilizar el vector de concentración en la construcción del modelo puede hacer pensar que el LRR es similar al PLS. No obstante, mientras que LRR da igual peso a cualquiera de las direcciones de la matriz de respuestas, el PLS tiende a dirigir dicha matriz hacia la estimación del analito de interés proyectando directamente esta matriz en el vector de concentración y no en la matriz de correlación. Al igual que los métodos PCR, PLS y RR este método es utilizado como alternativa a los métodos tradicionales de mínimos cuadrados cuando las variables presentan una alta colinearidad, dando en estos casos resultados comparables a dichos métodos (441).

Otro método desarrollado durante los últimos años, es la regresión local ponderada (LWR) (442-444) que es un método lineal basado en la idea de que una no linealidad puede ser aproximada mediante ecuaciones lineales locales. La estrategia seguida por este método es la siguiente: para cada una de las mezclas de predicción se encuentran aquellas mezclas de calibración que están geométricamente más cercanas a cada una de las mezclas en términos de los componentes principales más relevantes. Estas mezclas de calibración seleccionadas son utilizadas para llevar a cabo una regresión lineal ponderada, en donde el factor de peso es determinado de acuerdo con la distancia de las mezclas de calibración a la mezcla de predicción. El número óptimo de mezclas de calibración seleccionadas así como el número de factores puede determinarse mediante validación de cruce. Por lo tanto, en este caso, cada mezcla de predicción es estimada mediante un modelo diferente a diferencia de los otros métodos. Utilizando este método se han obtenido mejoras en la estimación entre un 30 y un 40 % con respecto a la regresión lineal (445).

El análisis factorial (FA) (446,447) es un método que se aplica a sistemas en los cuales no se conoce a priori la composición de los mismos. En su aplicación tiene lugar un proceso de deconvolución para estimar el espectro de cada uno de los componentes así como su concentración. El método parte de una serie de mezclas de calibración que contienen todos los componentes y solo difieren en la concentración de los mismos, que en principio es desconocida. La matriz original que contiene dichas mezclas se descompone mediante PCA para determinar el número de componentes presentes (igual al número de factores seleccionados) para posteriormente, determinar el espectro y concentración de los mismos. Este último proceso se lleva a cabo mediante un proceso de rotación, siguiendo un criterio determinado, de los componentes principales previamente seleccionados, de manera que son físicamente interpretables. Por lo tanto, el FA se compone de dos etapas como son la reducción del rango y la

rotación de los ejes. Puesto que se dispone a priori de una escasa información sobre la naturaleza del sistema, las estimaciones que da este presentan un cierto grado de indeterminación.

El método simplex es un método de optimización iterativa cuyo algoritmo ha sido adaptado para el análisis multicomponente, tanto para cuantificación como identificación de los componentes en muestras complejas (448,449). Este método no requiere el conocimiento previo del modelo matemático, por lo presenta la ventaja de estabilidad numérica, flexibilidad y su posible aplicación a sistemas no lineales. En este caso se lleva a cabo la minimización de una función de la forma:

$$U(p_i, c_i) = \sum_{i=1}^L (a_{\text{exp}} - a_{\text{calc}})^2$$

donde U , la función a minimizar, depende de varios parámetros (p_i) y/o concentraciones (c_i), L son los canales de medida (p.e., longitudes de onda) y a_{exp} y a_{calc} son las señales analíticas experimentales y calculadas a lo largo del proceso de optimización respectivamente. Puesto que es un método iterativo, es necesario partir de una serie de valores iniciales para los parámetros y/o concentraciones, los cuales son ajustados a lo largo del proceso para minimizar la función U . En cuanto al propio método simplex, suelen utilizarse algoritmos más eficaces con respecto al inicialmente propuesto como, por ejemplo, el método simplex modificado (SMS), el método simplex supermodificado (MSM) o el método simplex de tolerancia flexible (FTSM). Es un método muy eficiente en presencia de fuertes interacciones entre las variables o cuando el sistema está mal condicionado, aunque la convergencia del proceso en este caso puede ser lenta.

Uno de los métodos que en los últimos años ha demostrado su gran potencial y superioridad con respecto al PCR y al PLS en la resolución de

sistemas multivariantes, sobre todo no lineales, ha sido las redes neuronales artificiales (ANN) (450-452). El elemento fundamental del ANN es el nodo. Los nodos son ordenados en capas, el conjunto de las cuales forman una arquitectura de red. La red esta compuesta por lo menos de tres capas denominadas capa de entrada ("input"), una o más capas escondidas ("hidden") y capa de salida ("output"). En el caso de la calibración multivariante los nodos de la capa de entrada son obtenidos mediante una transformación lineal de las señales analíticas medidas a diferentes canales. Para reducir la dimensión de esta capa, así como mejorar la capacidad de predicción se puede utilizar los vectores "scores" de la matriz de calibración obtenidos mediante PCR (450) o PLS (453). En la capa escondida, conectada con la capa de entrada a través de conexiones ponderadas, tiene lugar una suma ponderada de los nodos de entrada seguida de una transformación mediante una determinada función que puede ser lineal o no lineal. Los factores de peso, que conectan cada nodo de la capa de entrada con los de la capa escondida, son ajustados durante el proceso de calibración, con el propósito de reducir el error de los nodos de la capa de salida. El número de nodos en la capa escondida juega el papel de variables intermedias y por lo tanto son ajustables. La capa de salida, conectada a la capa escondida, y en determinadas arquitecturas a la capa de entrada, suele estar compuesta, en el caso multivariante, de un único nodo correspondiente a la concentración del analito de interés.

Aunque en el caso de calibración no lineal la función básica comúnmente utilizada para llevar a cabo la transformación en la capa escondida es la función sigmoide, la selección de esta función se sigue haciendo de forma "ad hoc". Esto puede ser atribuido, en general, a la dificultad de predecir correctamente el comportamiento no lineal del sistema. No obstante, la incorporación de diferentes teorías químicas a través de sus correspondientes ecuaciones

dentro de la arquitectura de la red (“Chemnets”) puede ayudar a construir un modelo mucho más correcto para determinados sistemas.

Las principales desventajas del ANN es el gran número de mezclas de calibración requeridas para modelar apropiadamente el sistema, la complejidad matemática del proceso así como el tiempo requerido para llevar a cabo dicho proceso.

A.7.3. Parámetros estadísticos en calibración multivariante

Existen tres principales fuentes de error que pueden afectar a la calidad de un modelo de calibración en términos de su capacidad de predicción. Estas fuentes de error son: los errores del modelo, los errores en la concentración de los componentes de calibración y los errores en las señales analíticas. En este sentido, algunos autores (454,455) han desarrollado diferentes teorías de propagación de errores para la estimación de los errores de predicción. No obstante, la aplicación de estas teorías para la estimación del error de predicción tiene un sentido más teórico que práctico.

Desde el punto de vista estadístico la expresión más común del error de predicción de un modelo es el error cuadrático medio (MSE) que teóricamente está relacionado con la varianza residual (σ^2) y con el error sistemático de predicción denominado “bias”:

$$\text{MSE} = \sigma^2 + \text{bias}^2$$

Su estimación puede realizarse a partir de las mezclas de calibración (validación interna) o mediante un conjunto de mezclas de predicción (validación externa) y viene expresado en función de los residuales de concentración. En cualquier caso las mezclas utilizadas para estimar el MSE deben ser

representativas del conjunto total de la población, en caso contrario el valor obtenido puede ser inexacto.

En el caso de la validación externa, la estimación del MSE (MSEP) es conocido como error estándar de predicción (SEP), aunque también recibe el nombre de raíz del error cuadrático medio de predicción (RMSEP) (358) y raíz de la diferencia cuadrática media (RMSD) (456). El cálculo de este parámetro estadístico para cada uno de los componentes viene dado por:

$$SEP = \left(\frac{\sum_{i=1}^p (c_i - \hat{c}_i)^2}{p} \right)^{1/2}$$

donde c_i y \hat{c}_i son la concentración real y estimada del componente respectivamente y p es el número de mezclas de validación. El valor de SEP depende de la complejidad del modelo de calibración y su valor óptimo se obtiene cuando se equilibran los dos términos que componen el MSE durante la etapa de calibración. Este parámetro estadístico representa una desviación estándar de los errores de predicción medio, cuyo límite superior es la desviación estándar de la concentración de cada componente en las mezclas de predicción (457).

El numerador de la expresión anterior es comúnmente conocido como suma cuadrática de los errores residuales de predicción (PRESS):

$$PRESS = \sum_{i=1}^p (c_i - \hat{c}_i)^2$$

En ocasiones puede ser útil corregir el valor de SEP con respecto al error sistemático ("bias") como, por ejemplo, en el caso de que el instrumento utilizado cambie a lo largo del tiempo y sea necesario utilizar un método de referencia para ser ajustado o para corregir potenciales problemas durante un proceso de

estandarización instrumental. En este caso el valor de SEP también conocido como desviación estándar de predicción (SDP) vendría dado por (402,458):

$$\text{SEP}(\text{biased}) = \left(\frac{\sum_{i=1}^p (c_i - \hat{c}_i - \text{bias})^2}{p-1} \right)^{1/2}$$

El valor del “bias” debería ser estimado idealmente a partir de un conjunto de mezclas de predicción bien representativo y suficientemente grande. El valor medio del “bias” puede ser estimado simplemente como:

$$\text{bias} = \frac{\sum_{i=1}^p (\hat{c}_i - c_i)}{p}$$

Si todos los errores fueran aleatorios el valor de este “bias” debería ser aproximadamente igual a cero. Sin embargo, este tipo de corrección no debe ser empleado durante la validación de un modelo, puesto que en el caso de mezclas desconocidas la eliminación de este tipo de error sistemático no sería posible, al ser la concentración real de estas mezclas desconocido. Por otra parte, puesto que el valor del “bias” debe ser estimado estadísticamente, si dicha estimación no es correcta debido a que se obtiene con datos escasos o no representativos, la corrección de este “bias” puede introducir una mayor incertidumbre en el valor del SEP.

El valor total de SEP considerando todos los componentes vendría dado por (459):

$$\text{SEPT} = \left(\frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (c_{ij} - \hat{c}_{ij})^2}{pn} \right)^{1/2}$$

donde n es el número de componentes en las mezclas de predicción.

El valor de SEP es utilizado para comparar la capacidad de predicción de dos métodos de calibración multivariante a través de la aplicación de un test F (450,453):

$$F(p_1, p_2) = \left(\frac{SEP_1}{SEP_2} \right)^2$$

donde p_1 y p_2 son el número de mezclas utilizadas para calcular el SEP de los dos métodos (SEP_1 y SEP_2). El valor de F así calculado se compara con el valor teórico a un determinado nivel de confianza con p_1 y p_2 grados de libertad. Si el valor calculado es mayor que el teórico podemos decir que el método con un menor valor de SEP tiene una mayor capacidad de predicción con respecto al otro, al nivel de confianza correspondiente; o lo que es lo mismo, existen diferencias significativas en cuanto a la capacidad de predicción de ambos métodos. Igualmente, el valor de SEP ha sido utilizado para comparar la diferencia relativa de los errores de predicción de dos métodos a través de la expresión (457):

$$100 \frac{SEP_1 - SEP_2}{SEP_1}$$

Algunos autores en vez de utilizar el valor absoluto de SEP, utilizan valores relativos de dicho parámetro con respecto a la media de la concentración del componente en las mezclas de predicción (\bar{c}) (450,460):

$$SEP(\%) = \frac{100}{\bar{c}} \left(\frac{\sum_{i=1}^p (c_i - \hat{c}_i)^2}{p} \right)^{1/2}$$

Diferentes autores llaman a este valor raíz del error cuadrático medio de predicción relativo (RRMSEP) (461,462).

Otro parámetro estadístico relativo que se utiliza en la validación externa, es el conocido como error de predicción (PE) (153,463) aunque también recibe el nombre de desviación estándar relativa del residual de concentración (RSD) (464), error de predicción relativo (RPE) (432,465) y error de predicción relativo estándar (RSEP) (466). Este error de predicción se calcula normalmente para cada uno de los componentes aunque también se puede calcular para cada mezcla o globalmente considerando todos los componentes y mezclas, obteniendo un error de predicción relativo total que puede ser utilizado con fines comparativos entre diferentes modelos. El cálculo de este RPE global se lleva a cabo a partir de la siguiente expresión:

$$\text{RPE}(\%) = 100 \left(\frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (c_{ij} - \hat{c}_{ij})^2}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n c_{ij}^2} \right)^{1/2}$$

El RPE para cada componente se obtendría considerando $n=1$ en la ecuación anterior, mientras que el caso de las mezclas debería considerarse $p=1$. Alternativamente, se ha propuesto el cálculo del error relativo de predicción medio (MRPE) que vendría dado por la ecuación (432):

$$\text{MRPE}(\%) = \frac{100}{p} \sum_{i=1}^p \left(\frac{\sum_{j=1}^n (c_{ij} - \hat{c}_{ij})^2}{\sum_{j=1}^n c_{ij}^2} \right)^{1/2}$$

Puesto que normalmente la concentración de los componentes suele variar entre diferentes niveles, el valor del RPE debe considerarse únicamente como una idea del error de predicción que podemos encontrar entre dichos niveles. En general cuanto mayor es el número de componentes mayor será dicho

valor para una mezcla (464), o lo que es lo mismo, el RPE se incrementa cuanto menor es la selectividad del sistema.

Como apuntan Keller y col. (467) no es suficiente, en la práctica, con obtener un valor de SEP pequeño, sino que se requiere que la concentración estimada y la real estén directamente relacionadas o lo que es lo mismo, que el modelo de calibración obtenido ajuste de forma adecuada la superficie de respuestas. Por consiguiente una correlación razonable entre ambas concentraciones es un prerequisite para que un modelo de calibración sea correcto. En consecuencia es necesario aplicar un criterio basado en la correlación como, por ejemplo, el coeficiente de correlación (R) o el cuadrado del mismo (R^2) también conocido como coeficiente de correlación múltiple (375). El cálculo de dicho coeficiente para cada uno de los componentes se lleva a cabo mediante la expresión (456):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^p (c_i - \hat{c}_i)^2}{\sum_{i=1}^p (c_i - \bar{c}_i)^2}$$

o, alternativamente (467)

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (\hat{c}_i - \bar{c}_i)^2}{\sum_{i=1}^p (c_i - \bar{c}_i)^2}$$

Un modelo de calibración no puede considerarse correcto si no hay suficiente correlación ($R > 0.9$) entre la concentración estimada y la real. Por lo tanto, para cualquier modelo además de calcular el SEP, es necesario aplicar un criterio de correlación para cualificar dicho modelo (467). Por otra parte, mediante la comparación de los valores de R para diferentes modelos, se puede optimizar la forma teórica de la función del modelo que mejor se ajusta al sistema analítico.

Cuando la estimación del MSE se realiza a partir de las mezclas de calibración (validación interna) recibe el nombre de error cuadrático medio de estimación (MSEE). El parámetro estadístico más comúnmente utilizado es la raíz cuadrada del MSEE, conocido como error estándar de calibración (SEC), error estándar de estimación (SEE) o simplemente raíz del error cuadrático medio de estimación (RMSEE) (358). Este parámetro estadístico viene definido como:

$$SEC = \left(\frac{\sum_{i=1}^m (c_i - \hat{c}_i)^2}{m - df} \right)^{1/2}$$

donde en este caso c_i y \hat{c}_i son la concentración real y estimada del componente en las mezclas de calibración, respectivamente; m es el número de mezclas de calibración y df son los grados de libertad utilizados para ajustar el modelo de regresión. Generalmente este parámetro estadístico debe ser considerado más como un límite inferior a la capacidad de predicción, que como una medida de la propia capacidad de predicción, puesto que el SEC representa a un modelo sobreajustado en el que todas las mezclas de predicción son incluidas para obtener el modelo de calibración (458).

A.7.4. Diseño experimental en calibración multivariante

Un modelo de calibración puede ser estimado de manera que el SEC sea mínimo, pero el SEP puede ser inaceptable debido a que las mezclas de calibración no abarcan el dominio de las mezclas de validación. Puesto que un modelo es utilizado generalmente con fines de predicción, el propósito del diseño experimental de la calibración es obtener un modelo con una capacidad de predicción lo más precisa y exacta. Los principios generales y las ideas básicas para la selección de las mezclas de calibración son desarrolladas por Naes e Isaksson (468,469). De

acuerdo con estos autores el diseño de un experimento de calibración debe incluir dos aspectos básicos:

- Abarcar todas las causas de variabilidad sistemática, incluidas interferencias.
- Minimizar el efecto de los diferentes ruidos aleatorios.

En este sentido, cuanto mayor es el número de experimentos utilizados para obtener el modelo, mayor es la posibilidad de incluir en el mismo fuentes de no linealidad y problemas de heterogeneidad por lo que, desde el punto de vista del modelo matemático, este debería ser desarrollado a partir de un rango pequeño de experimentos. Por otra parte, los parámetros del modelo deben ser estimados estadísticamente, lo cual requiere un rango amplio de experimentos para minimizar el efecto del ruido aleatorio. Por lo tanto, al realizar un diseño experimental se debe llegar a un compromiso entre la optimización de la estructura del modelo y la estimación de sus parámetros y teniendo en cuenta, además, consideraciones de costo, tiempo y disponibilidad de experimentos.

Por consiguiente, la idea fundamental en el diseño experimental es que todos los fenómenos o causas de variabilidad sistemática de las señales analíticas deben ser tenidos en cuenta durante la etapa de calibración y descritos por el modelo. En este sentido, cada fenómeno debería ser abarcado lo mejor posible y separado del resto de los fenómenos y del ruido. Desde el punto de vista de la calibración multivariante, el diseño experimental se refiere a la selección de una serie de mezclas de calibración para la obtención del modelo, considerando cada mezcla como un experimento. Sin embargo, una de las principales carencias de los diseños experimentales es el hecho de que rara vez consideran la expresión matemática del modelo de regresión utilizado para seleccionar dichas mezclas.

Dentro de lo que es el diseño experimental, hay que concretar que factores experimentales hay que controlar y como combinarlos (diseño controlado). Una vez identificados dichos factores es necesario seleccionar los niveles discretos a los cuales cada uno de ellos variará. En el caso de los factores cualitativos el número de niveles suele ser dos (p.e., ausente o presente), mientras que en el caso de los factores cuantitativos el número de estos puede ser superior (p.e., diferentes niveles de concentración). Una vez seleccionados debemos decidir la combinación de niveles de los factores. De acuerdo con el método de combinación utilizado, tendremos un número diferente de experimentos a realizar.

En el caso de que existan factores no controlados (interferencias físicas o químicas), sus efectos deben ser minimizados. Una forma de tener en cuenta dichos efectos, es la incorporación, al diseño controlado, de experimentos cuyos factores varíen aleatoriamente, para así aumentar la posibilidad de que todas las fuentes importantes de variabilidad se tengan en cuenta. El caso extremo es la utilización de un diseño totalmente aleatorio (también conocido como diseño natural).

Dentro de la calibración multivariante existen dos tipos principales de diseño. El primero corresponde a la situación en la que es posible generar una serie de mezclas de calibración en función de la concentración de cada uno de los componentes (factores del diseño). El segundo tipo consiste en seleccionar las mezclas de calibración en función de su señal analítica, a partir de un conjunto de mezclas, las cuales normalmente se han obtenido de forma aleatoria. En este caso un aspecto importante es la forma en que las mezclas son seleccionadas y no el número de mezclas seleccionadas.

Dentro del primer tipo de diseños el más utilizado es el **diseño factorial**, también llamado diseño ortogonal, el cual consiste en considerar todas las posibles combinaciones o interacciones de los factores, a todos los niveles discretos seleccionados. El número total de mezclas se obtendría multiplicando

el número de niveles para cada uno de los factores, es decir, Z^f , donde Z es el número de niveles y f el número de factores. Presenta la desventaja de que el número de mezclas se incrementa rápidamente al aumentar el número de factores. En este caso se puede utilizar una variante de este método conocida como **diseño factorial fraccionado** el cual utiliza una fracción del número total de mezclas requeridas en el diseño factorial. Este método considera que las interacciones de menor orden entre los distintos factores son más importantes que las de orden superior, las cuales pueden ser despreciadas al ser redundantes. Su principal ventaja es que puede ser utilizado para investigar los efectos de un gran número de factores con un número pequeño de mezclas.

Otro diseño es el diseño de composición central o de Box-Wilson, que es un diseño a dos niveles y que para un número dado de factores (f) requiere $2^f + 2f + 1$ mezclas más alguna réplica en el punto central del diseño. Este tipo de diseño pertenece a un conjunto más general de diseños conocidos como **diseños de respuesta de superficie**.

Los diseños factorial y factorial fraccionado tienden a dar una visión general del sistema y por lo tanto sirven fundamentalmente para construir una forma general del modelo, mientras que los diseños de respuesta de superficie, como el de composición central son útiles para construir un modelo cuantitativo (470).

Dentro de este primer tipo de diseños uno de los más utilizados es el **diseño simplex**, el cual impone una limitación a la posible combinación de niveles. En este caso, la suma de niveles para cada uno de los factores debe sumar un valor constante ("closure"). Por lo tanto, la composición de cada una de las mezclas de n componentes puede ser representada en un simplex en el espacio $n-1$ dimensional. Mediante esta representación se determina que proporción en cada mezcla es necesario utilizar para obtener una visión global

de la superficie de respuestas. El número total de mezclas, para un mismo simplex, es función del número de niveles para cada uno de los n componentes.

El segundo tipo de diseños o de selección de mezclas están basados en el valor de la señal analítica. En este caso las mezclas son seleccionadas de acuerdo con la idea de como los valores de la señal analítica deberían ser distribuidos para obtener un modelo de calibración adecuado. Varios autores han propuesto diferentes métodos de selección basándose en dicha idea (471-474). Algunos de estos diseños presentan la desventaja de necesitar información sobre la estructura cualitativa de las mezclas, es decir, que componentes están presentes así como la señal analítica correspondiente a cada uno de ellos (espectros puros).

Mediante estos diseños se reduce el volumen del espacio de diseño, lo que puede minimizar problemas asociados a la falta de ajuste del modelo, como puede ser la presencia de no linealidades. De esta manera la variación en la mezclas de calibración en dicho espacio será similar a las de predicción, y además se consigue que la etapa de calibración sea más robusta frente a factores no controladas.

Desde el punto de vista estadístico Brown (475) lleva a cabo un estudio de como influye un diseño aleatorio o controlado en los métodos de calibración multivariante, llegando a la conclusión de que en el caso de utilizar un diseño aleatorio, si las mezclas se distribuyen según una distribución normal, los métodos inversos son preferibles frente a los métodos directos, como métodos de calibración. Este hecho es igualmente señalado por Fuller y col. (476) que mantienen que al utilizar métodos inversos tales como el PLS es importante que la concentración de cada componente varíe de forma aleatoria en las mezclas de manera que las concentraciones no estuvieran correlacionadas o fueran colineales. Un método útil para identificar la existencia de estas correlaciones, es representar la concentración de cada componente frente a la concentración de cada uno de los demás

componentes y calcular el valor del coeficiente de correlación o la covarianza (476,477). Un valor pequeño de dichos parámetros indicaría una distribución aleatoria de dichas concentraciones.

A.7.5. Selección de señales analíticas

Cualitativamente, la complejidad del problema de seleccionar las longitudes de onda, y en general, cualquier señal analítica, puede definirse como: las longitudes de onda óptimas no se pueden seleccionar de forma analítica (deductiva) por lo que es necesario utilizar un método de optimización (inductivo). No obstante, en un principio la selección se hacía de forma empírica basándose en las características cualitativas de los espectros de cada componente (478). Para una definición más cuantitativa de la complejidad del problema se debe considerar el volumen del espacio de búsqueda, es decir, el número total de combinaciones posibles entre todas las longitudes de onda del espectro, que viene dado por la expresión:

$$\frac{L!}{b!(L-b)!}$$

donde L es el número de longitudes de onda del espectro las cuales son tomadas en grupos de b longitudes de onda. Puesto que el valor de b tiene que ser igualmente calculado, la optimización sería prácticamente imposible si no se utiliza un determinado criterio.

A través de los métodos de selección de longitudes de onda lo que se pretende es mejorar la precisión y exactitud del modelo. Para mejorar la exactitud, las longitudes de onda son seleccionadas basándose en un criterio de selectividad y/o sensibilidad (479), siendo los métodos basados en tales criterios los habitualmente utilizados. Aunque teóricamente, la precisión es mejor cuanto

mayor es el número de longitudes de onda seleccionadas (480), sin embargo, esto, a menudo, viene acompañado de una pérdida en la exactitud. Puesto que precisión y exactitud están en competencia, para llegar a un compromiso lo ideal sería llevar a cabo una optimización simultánea de ambas. En este sentido, Lucasius y col. (481) hacen un estudio comparativo de tres métodos de selección de longitudes de onda basándose en criterios de precisión y exactitud. A pesar de observar que uno de los métodos (algoritmo genético) es mejor frente a los otros dos, concluyen que puesto que los resultados obtenidos dependen de los datos utilizados, no se puede decir que este método sea superior frente a otros cuando se aplica a otros sistemas analíticos.

Un método de selección ha sido el propuesto por Sustek (482) que utiliza como criterio la desviación estándar relativa de las señales analíticas de cada componente, observando que un aumento considerable del número de longitudes de onda no tiene un significado práctico e incluso hace disminuir la precisión y exactitud de la concentración estimada.

Brown y col. (374) utilizan diferentes criterios de selección tales como la anchura de las bandas, su solapamiento, absorptividades y relación señal-ruido (S/N), observando que los errores obtenidos estaban relacionados principalmente con la relación S/N y el solapamiento espectral.

La utilización de la relación S/N como criterio de selección presenta la ventaja de que solamente se seleccionan aquellas longitudes de onda que están menos afectadas por interacciones. En este sentido, se han propuesto otros métodos basados en dicho criterio. Así, Salamin y col. (483) consideran un valor óptimo de la relación S/N para seleccionar las longitudes de onda. Sin embargo, el problema es escoger el valor óptimo para la relación S/N , puesto que cuanto menor es dicho valor mayor es el número de longitudes de onda seleccionadas lo cual, como ya se ha comentado, por una parte mejora el

modelo pero por otro la calidad de los datos se deteriora, lo que puede hacer que el modelo obtenido tenga una mala capacidad de predicción. Por lo tanto el valor óptimo sería aquel que presentara un equilibrio entre la mejora del modelo y la calidad de los datos utilizados. Por otra parte, Brown (484) utiliza la función χ^2 para seleccionar el número de dichas longitudes de onda. En este caso el número de longitudes de onda es elegido de manera que minimice el intervalo de confianza de la concentración estimada, el cual es proporcional a una expresión que está directamente relacionada con la función χ^2 . Relacionado con este método Jouan-Rimbaud y col. (485) demuestran que las longitudes de onda seleccionadas mediante este método son las mismas que las seleccionadas considerando como criterio la correlación de la matriz de señales analíticas con la concentración de cada componente. Igualmente, Navarro Villoslada y col. (160) utilizan la relación S/N como criterio de selección, considerando como número óptimo de longitudes de onda aquel que de lugar a un valor mínimo del SEP.

Un criterio muy utilizado en el caso del método CLS, es el número de condición de la matriz de calibración ($\text{cond}(\mathbf{K})$) (160,486,487), donde \mathbf{K} es la matriz obtenida durante la etapa de calibración al aplicar el método CLS. El $\text{cond}(\mathbf{K})$ es una medida de selectividad o calidad global del sistema (488). De acuerdo con la teoría de propagación de errores (383) el $\text{cond}(\mathbf{K})$ representa un límite superior del error relativo de la concentración estimada. Relaciona los errores relativos de la concentración con los errores de la señal analítica y de la matriz \mathbf{K} :

$$\frac{\|\Delta \mathbf{c}\|}{\|\mathbf{c}\|} \leq \text{cond}(\mathbf{K}) \left(\frac{\|\Delta \mathbf{a}\|}{\|\mathbf{a}\|} + \frac{\|\Delta \mathbf{K}\|}{\|\mathbf{K}\|} \right)$$

donde $\|\cdot\|$ representa la norma del vector, la relación $\|\Delta \mathbf{c}\|/\|\mathbf{c}\|$ es el error relativo en el vector de concentración, mientras que $\|\Delta \mathbf{a}\|/\|\mathbf{a}\|$ y $\|\Delta \mathbf{K}\|/\|\mathbf{K}\|$ tienen un

significado similar pero referido a la señal analítica y a la matriz **K** respectivamente. Δ representa la diferencia entre el valor real y el medido o estimado. Puesto que en muchos casos el error relativo en la matriz **K** es mucho menor que el de la señal analítica, esta expresión se suele simplificar:

$$\frac{\|\Delta c\|}{\|c\|} \leq \text{cond}(K) \frac{\|\Delta a\|}{\|a\|}$$

Esta ecuación indica el máximo error relativo posible del vector de concentración pero no de los componentes individuales de dicho vector.

El número de condición ha recibido multitud de interpretaciones, todas ellas relacionadas con la exactitud y precisión del sistema. Ha sido considerado como una medida directa de la amplificación del error relativo de las señales analíticas en el error relativo de la concentración estimada, o lo que es lo mismo, la sensibilidad de los datos a la amplificación del error. Ha sido considerado también como una indicación de la estabilidad del sistema en cuanto a si está bien o mal condicionado, lo cual está relacionado con el error potencial que se tiene al estimar la concentración. Ha sido relacionado con los errores experimentales, el grado de solapamiento espectral, las interferencias químicas y con la correcta aproximación de la concentración estimada a la concentración real. En definitiva, los métodos que utilizan el número de condición como criterio de selección se basan en la minimización de dicho valor para obtener, por consiguiente, modelos más precisos y exactos.

Frans y Harris (489) utilizan como criterio de selección los elementos de la matriz de varianza-covarianza. Los factores de varianza identifican aquellas longitudes de onda que proporcionan una mayor precisión en la estimación de la concentración, especialmente en el caso de un gran solapamiento espectral.

Thijssen y col. (490) proponen un método basado en el filtro de Kalman y en la teoría de la información, considerando diferentes criterios de precisión. Una ventaja que presenta este método es la posibilidad de evaluar la precisión de forma “on-line” a lo largo de las longitudes de onda seleccionadas debido al carácter iterativo del KF.

Juhl y Kalivas (491) evalúan como criterios de selección diferentes características analíticas del sistema para cada componente, como selectividad, sensibilidad, exactitud, propagación de errores y límite de detección. Estas características analíticas son obtenidas de forma teórica considerando el concepto de señal analítica neta definida como la parte de la señal analítica que es ortogonal al espectro de los otros componentes (492). En este caso observan que el límite de detección parece ser el criterio más útil.

Otro método, es el propuesto por Garrido Frenich y col. (493) quienes utilizan como criterio los valores máximos de los coeficientes de regresión del modelo obtenido mediante PLS. Las longitudes de onda seleccionadas coinciden, en general, con los máximos de absorbancia y de mayor selectividad, mientras que en el caso de un gran solapamiento espectral, las longitudes de onda seleccionadas no coinciden con dichos máximos. Otro método relacionado con los coeficientes de regresión obtenidos mediante PLS es el propuesto por Bjorsvik y Bye (494). En este caso las longitudes de onda son seleccionadas a partir de una representación gráfica de dichos coeficientes frente a la probabilidad normal acumulada de cada uno de ellos.

A.7.6. Aplicaciones de la calibración multivariante en FIA

El acoplamiento de los instrumentos conocidos como multidimensionales a la técnica FIA ha permitido ampliar el campo de aplicación y versatilidad de esta técnica al análisis multicomponente gracias al empleo de la quimiometría y más concretamente de la calibración multivariante.

Antes de la aplicación de la calibración multivariante en FIA, la determinación multicomponente de varios analitos se realizaba mediante configuraciones muy complejas, empleando una o varias válvulas de inyección, técnicas especiales como la extracción líquido-líquido, la separación en membrana o columnas empaquetadas con un determinado reactivo y el acoplamiento a uno o varios detectores en serie o en paralelo; todo ello para conseguir una mayor selectividad. En este sentido hay que destacar la revisión bibliográfica de Kuban (495) sobre el empleo de diferentes técnicas y configuraciones para la determinación multicomponente, ya sea simultánea o secuencial, de varios analitos utilizando la técnica FIA.

Como ya se ha comentado, los instrumentos se dividen en diferentes ordenes, dependiendo de la cantidad de información que puede dar (349). Son, en este caso, los instrumentos de orden uno y de orden dos, los conocidos como multidimensionales, los que se utilizan como detectores acoplados a un sistema FIA-calibración multivariante (FIA-CM). Dentro de los detectores de orden uno el más utilizado con diferencia es el espectrofotómetro UV-VIS de matriz de fotodiodos integrados (496), aunque también se han utilizado otros detectores como los electroquímicos (497) y el espectrofotómetro de infrarrojo (498). De los detectores de orden dos el fluorímetro ha sido el único acoplado a un sistema FIA-CM (499,500).

Los métodos utilizados para la determinación simultánea pueden clasificarse como métodos cinéticos y no cinéticos o convencionales. Los métodos cinéticos están basados en una reacción cinética entre los compuestos que forma la mezcla y uno o varios reactivos. En este caso se utilizan procedimientos de flujo parado mediante los cuales, una vez que la muestra y los reactivos llegan al detector, el flujo se para y se registra la curva cinética o la variación del espectro a lo largo del tiempo (465,501,502). Por el contrario y en general, en los métodos no cinéticos el flujo no se para, registrándose el espectro de forma continua a lo largo del tiempo y seleccionando los datos en el máximo del pico FIA para la posterior aplicación de la calibración multivariante (86,461,503).

Una de las primeras aplicaciones del sistema FIA-CM es la llevada a cabo por Zagatto y col. (504) que determinan Ni(II), Cu(II) y Zn(II) en aceros aplicando un método CLS-GSAM. Sin embargo, utilizan un instrumento de orden cero, como es un ICP-AES, por lo que tienen un sistema de ecuaciones determinado, es decir, el mismo número de ecuaciones (longitudes de onda) que de analitos. En este caso, la muestra y la disolución estándar son inyectadas simultáneamente mediante un inyector proporcional.

Blanco y col. (328,344,505,506) llevan a cabo varios estudios sobre la aplicación y capacidad que presenta el espectrofotómetro de matriz de diodos junto con la técnica FIA, la espectrofotometría derivada y la calibración multivariante para la determinación simultánea de varios analitos. Se consideran dos aspectos diferentes en estos estudios:

- La obtención del espectro bajo condiciones de máxima reproducibilidad y sensibilidad en el máximo del pico FIA. En este sentido desarrollan dos programas para controlar la obtención de dicho espectro dependiendo de que la inyección de la muestra sea automática o manual.

- El tratamiento matemático involucrado en la resolución y cuantificación de las muestras, para lo cual comparan tres métodos, uno gráfico y dos numéricos. Estos métodos numéricos son el análisis multicomponente directo (DMA) y el MLR basados en la aplicación directa de la ley de Lambert-Beer y por lo tanto relacionados con el método CLS.

La primera referencia en cuanto a la aplicación del método PLS a un sistema FIA la hacen Lukkari y Lindberg (507) que llevan a cabo la determinación de cinco ácidos orgánicos mediante una valoración ácido-base. La mezcla de los ácidos es inyectada en una disolución de NaOH que actúa de portador y, dependiendo del volumen inyectado, la forma básica y/o ácida de dichos ácidos es detectada espectrofotométricamente.

En cuanto los métodos de calibración multivariante, los más utilizados son los métodos bilineales, sobre todo el PLS aunque también se han aplicado otros métodos tales como el CLS (86,462,500), ILS (499), KF (86,497,501), ANN (452), métodos de análisis factorial (508-510), etc. En la tabla VII se resume algunas de las aplicaciones de los métodos de calibración multivariante en FIA.

Una técnica emparentada con el FIA y la cual ha sido igualmente utilizada junto con la calibración multivariante es el análisis por inyección secuencial (SIA) en la cual, como su nombre indica, la muestra y los reactivos son inyectados o aspirados secuencialmente para posteriormente ser propulsados hacia el detector de forma conjunta. Así, Gómez y col. (511) utilizan una autobureta para llevar a cabo dicho proceso en la determinación de Ca(II) y Mg(II) aplicando el método CLS.

Por último, puesto que la calibración multivariante necesita de un gran número de datos (mezclas) para poder modelar el sistema adecuadamente, la utilización de la técnica FIA presenta la ventaja de permitir adquirir dichos datos de forma rápida, simple, segura y con un bajo costo.

TABLA VII. Aplicación de la calibración multivariante en FIA

Analitos	Método de calibración multivariante	Referencia
Clorofenoles	CLS, KF, PLS	86
Fe(III), Co(II), Zn(II)	PCR, PLS, ANN	452
PO ₄ ³⁻ , Cl ⁻	PLS	461
Ni(II), Fe(II)	PLS	462
Fe(III), Co(II), Zn(II)	PLS	465
Pb(II), Tl(I)	KF	497
Acetona, etanol, THF	PLS	498
Acidos fenólicos	ILS	499
Zn(II), Cd(II), Pb(II), Mg(II), Al(III)	CLS, PLS	500
La(III), Pr(III), Nd(III)	EKF	501
Pesticidas	PLS	502
Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cu(II)	CLS	503
Complejos de cloruro de Bi(III)	WFA	510
Carbaril y clorpirifos	PLS	512
Cu(II), Zn(II)	PLS	513
Ca(II), Mg(II), Cu(II)	PLS	514
Indicadores	PLS-GSAM	515
Aminoácidos	PCR, PLS	516
Catecol, Resorcinol	CLS	517
Acidos débiles	PLS	518
Triazinas	PLS	519
Ni(II), Co(II)	PLS	520
Cu(II), Zn(II)	PLS	521
Fe(III), HNO ₃	PLS	522
Tierras raras	CLS	523
Gluconato/Acetato	PLS	524

B. FINALIDAD y PLANTEAMIENTO

La revisión bibliográfica pone de manifiesto la importancia que, desde el punto de vista medioambiental, han adquirido los fenoles, once de los cuales se encuentran incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA). De estos once fenoles contaminantes prioritarios destacan por su toxicidad, el 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol.

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, la presencia de estos clorofenoles es consecuencia de la gran incidencia que tienen sobre numerosos la madera y desde 1940 se utiliza también como herbicida de contacto. Otros clorofenoles contaminantes prioritarios son productos de degradación de fenoxiácidos como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o el ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA), ampliamente utilizados como herbicidas de traslocación. Otra fuente de contaminación ambiental de clorofenoles radica en los procesos de cloración de aguas de consumo público, pues dado el carácter extremadamente reactivo del cloro, produce la cloración del fenol procedente de la degradación biológica de los detergentes de uso doméstico.

Dada la importancia que estos fenoles tienen sobre la salud humana, así como sobre el equilibrio ecológico de numerosas especies, tanto animales como vegetales, diferentes países han establecido normas relacionadas con el uso de los fenoles, así como con su presencia en aguas, lodos y organismos o con su análisis en diferentes tipos de muestras. En este sentido, los fenoles pueden determinarse bien en forma conjunta, refiriendo los resultados al contenido total de fenoles, o bien de forma individual. En el primer caso, la determinación se realiza principalmente mediante la espectrofotometría UV-VIS, siendo el método de la 4-aminoantiprina (4-AAP) el recomendado en las normas europeas. Sin embargo, puesto que ni la toxicidad, ni la incidencia medioambiental es la misma para cada fenol, frecuentemente es necesaria la determinación individual de las especies, para lo cual se requiere el empleo de técnicas cromatográficas que incluyen complejas manipulaciones de la muestra, pues dada la polaridad de estos analitos, en el caso de la cromatografía de gases se precisan reacciones de derivatización y en el caso de la cromatografía líquida la separación previa de la matriz, la cual también tiene propiedades polares.

La presente memoria tiene como finalidad estudiar el empleo de procedimientos matemáticos basados en la calibración multivariante y el análisis multicomponente, para la determinación espectrofotométrica individual de los clorofenoles contaminantes prioritarios 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol sin separación previa, lo que, al simplificar el proceso de preparación de la muestra, puede constituir una interesante alternativa a los métodos cromatográficos.

En primer lugar, se estudia la influencia que diferentes sales de amonio cuaternario, Hyamina-3500 (Hy-3500), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), nitrato de tetrabutilamonio (TBA), nitrato de tetrapropilamonio (TPA) y nitrato de tetrametilamonio (TMA), tienen sobre el proceso de extracción de los cloro-

fenoles. En este estudio se incluye, también, la influencia del pH de extracción, tipo de disolvente orgánico y concentración de la sal de amonio cuaternario empleada. Una vez seleccionadas las condiciones químicas más adecuadas para la determinación extractivo-espectrofotométrica de los clorofenoles, se procede a su determinación multicomponente, ensayando primero un método directo de regresión clásica de mínimos cuadrados (CLS) en el cual la matriz de referencia o de calibración se obtiene a partir de los espectros de los componentes puros. Se estudia seguidamente el empleo de la calibración multivariante CLS en la cual la matriz de calibración se deduce mediante regresión lineal de mínimos cuadrados a partir de una serie de mezclas que contienen los diferentes clorofenoles. Finalmente se estudia, con fines comparativos, otros métodos de calibración multivariante como la regresión inversa de mínimos cuadrados (ILS), el filtro de Kalman (KF), la regresión de componentes principales (PCR) y la regresión parcial de mínimos cuadrados (PLS) además del CLS ya mencionado. Simultáneamente a estos estudios, se ensayan y proponen diferentes criterios tendentes a optimizar el número mínimo de mezclas a utilizar en la etapa de calibración, así como a la selección de las longitudes de onda más adecuadas a utilizar en la estimación de la concentración de cada uno de los clorofenoles.

Teniendo en cuenta la ventaja que presenta, por su sencillez y versatilidad, el análisis por inyección en flujo (FIA) y dada la dificultad que supone el procedimiento manual de determinación extractivo-espectrofotométrica simultánea de los clorofenoles, especialmente en la etapa de calibración, se dedica una segunda parte de esta tesis a la automatización de la determinación de los clorofenoles. En esta parte se estudian nuevamente los métodos de calibración multivariante CLS, ILS, KF, PCR y PLS, seleccionando en cada caso las condiciones idóneas que dan lugar a los resultados más precisos y exactos, como son las longitudes de onda a emplear en la estimación multicomponente, el número óptimo de factores o variables latentes para el caso del PCR y

PLS y la detección de mezclas de calibración que se encuentran fuera del intervalo muestral (“outliers”).

El método FIA que se propone se aplica a la determinación de clorofenoles contaminantes prioritarios en diferentes muestras de aguas, estudiándose también la viabilidad de estos métodos de calibración multivariante en matrices muy complejas, como sería el caso de muestras de orina, en que los componentes naturales suponen una fuerte interferencia en la estimación del contenido de clorofenoles.

C. PARTE EXPERIMENTAL

C.1. APARATOS Y MATERIAL

- Espectrofotómetro de matriz de fotodiodos integrados modelo Hewlett Packard 8452A conectado a un ordenador Hewlett Packard Vectra y este a su vez a una impresora Hewlett Packard Thinkjet.

- Analizador de inyección de flujo Fiastar modelo Tecator 5020 compuesto de dos bombas peristálticas y una válvula de inyección hexagonal de volumen variable.

- Bomba peristáltica Isco modelo Wiz con cuatro canales de bombeo.

- Rotavapor Heidolph modelo VV 2000.

- Evaporador Kuderna-Danish.

- Extractor Soxhlet.

- Baño de ultrasonidos modelo Agimatic 243.

- pH-metro modelo PHM82 Standard Radiometer equipado con un electrodo de vidrio Hamilton.

- Balanza analítica modelo Sartorius Handy de 0.1 mg de sensibilidad analítica.
- Manta calefactora Selecta modelo Fibroman-C.
- Baño termostático Selecta modelo Aquaterm.
- Cubeta espectrofotométrica de cuarzo Q de 1 cm de paso óptico
- Cubeta de flujo Hellma de cuarzo QS de 1 cm de paso óptico y 18 μ l de volumen interno.
- Separador de fases de membrana de teflón.
- Columnas de teflón de 6 x 0.5 cm
- Tubos para bomba peristáltica de Tygon que proporcionan caudales variables.
- Tubos de teflón para conducciones y reactores de diferentes diámetros internos.
- Conexiones de teflón en forma de T.
- Membranas de nylon de 0.45 μ m de diámetro de poro.
- Refrigerador de bolas.
- Matraces aforados, pipetas y demás material volumétrico de calidad contrastada perteneciente a diferentes marcas.

C.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- Clorofenoles.

Se prepararon disoluciones de 100 mg/L de los siguientes clorofenoles: 2-clorofenol (2CF), 4-cloro-3-metilfenol (4C3MF), 2,4-diclorofenol (DCF), 2,4,6-triclorofenol (TCF) y pentaclorofenol (PCF). En todos los casos se disuelven 10.0 mg de cada uno de ellos en 2 ml de NaOH 0.1 M enrasando posteriormente a 100 ml con agua. Las disoluciones se homogeneizan en un agitador de ultrasonidos durante 1 minuto.

- Sales de amonio cuaternario.

Se prepararon disoluciones de 5000 mg/L de las siguientes sales de amonio cuaternario: Hyamina-3500 (Hy-3500), bromuro de cetiltributilamonio (CTAB), nitrato de tetrabutilamonio (TBA), nitrato de tetrapropilamonio (TPA) y nitrato de tetrametilamonio (TMA). En todos los casos se disuelven 0.5 g de la sal de amonio cuaternario en agua, aforando a 100 ml. Las disoluciones se introducen en el agitador de ultrasonidos durante 1 minuto para facilitar su disolución y homogeneización

- Disoluciones reguladoras.

Ácido acético/acetato 0.01 M de pH 4.7 preparada a partir de una disolución de acetato sódico y posterior adición de HCl hasta conseguir el pH indicado.

$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.01 M de pH 7.4 preparada a partir de una disolución de K_2HPO_4 y posterior adición de HCl hasta conseguir el pH indicado.

$\text{H}_3\text{BO}_3/\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ 0.01 M de pH 9.1 preparada a partir de una disolución de Bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) y posterior adición de HCl hasta conseguir el pH adecuado. En las aplicaciones en sistema FIA esta disolución contiene una concentración 0.05 M de NaCl para fijar la fuerza iónica.

NaOH 0.01 M de pH 12 preparada disolviendo 0.04 g de NaOH en 100 ml de agua.

- Orina comercial liofilizada (SIGMA).

Dos tipos de orina liofilizada:

- 1.- Únicamente los con componentes de peso molecular menor de 10000.
- 2.- Con los componentes de peso molecular mayor de 10000 de los cuales el 60% son proteínas.

Ambos tipos de orina se disolvieron en agua, 5 g de la primera en 250 ml y 8 mg de la segunda en igual volumen, homogeneizando en baño de ultrasonidos durante 1 minuto.

- **Resina XAD-4** (ROHM and HAAS).

- **Enzima β -glucuronidasa** (SIGMA) tipo HP-2 (100000 unidades/ml) con actividad sulfatasa (5000 unidades/ml).

- **Disolventes orgánicos.**

Metanol.

Diclorometano

1,2-dicloroetano

Tetracloruro de carbono.

Cloroformo.

Tolueno.

Acetona.

Acetonitrilo.

Hexano.

- **Otras disoluciones.**

NaOH 0.1 M preparada disolviendo 0.4 g de NaOH en 100 ml de agua.

NaOH 10 M preparada disolviendo 40 g de NaOH en 100 ml de agua.

H₂SO₄ concentrado del 96%.

HCl concentrado del 35%.

HCl 3M preparado por dilución de 26.4 ml de HCl del 35% a 100 ml con agua y extraído con hexano y tolueno.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica y el agua purificada mediante un aparato Milli Q.

C.3. MUESTRAS

- Agua de consumo público.

La toma de muestra se realizó en el mismo laboratorio. Se dejó correr el agua del grifo durante 10 minutos a un caudal de aproximadamente de 2 L/min, transcurridos este tiempo se tomó la cantidad adecuada para realizar varios análisis, se acidificó a razón de 5 ml de H_2SO_4 por litro de muestra y se guardó en frigorífico hasta el momento del análisis.

- Agua de río.

La muestra se tomó en el río Torote al este de la Comunidad de Madrid, en una zona de gran actividad agrícola y pecuaria, pero ausente de vertidos urbanos. La muestra colectada se acidificó y conservó como en el caso anterior.

- Orina humana.

Se tomó la orina de primera hora de la mañana de diferentes individuos sanos de edades comprendidas entre 15 y 28 años. Las botellas utilizadas para la recogida fueron previamente limpiadas con mezcla crómica y acetona y secadas antes de su uso. Las muestras se guardaron en frigorífico un tiempo máximo de 48 horas.

C.4. PROCEDIMIENTOS

C.4.1. Método manual

C.4.1.a. Estudio extractivo-espectrofotométrico de los distintos clorofenoles en presencia de sales de amonio cuaternario

En un embudo de separación se añade 1 ml de la disolución de 100 mg/L del clorofenol, 3 ml de la disolución de sal de amonio cuaternario, 3 ml de disolución reguladora y el resto de agua hasta un volumen final de 10 ml. Cada clorofenol se extrae con 9 ml de 1,2-dicloroetano en tres etapas, en cada una de las cuales se adicionan 3 ml de disolvente orgánico. Se agita durante 1 minuto y tras la separación de las fases se recogen los extractos orgánicos en un matraz de 10 ml, el cual se enrasa con 1,2-dicloroetano después de la última extracción.

Los espectros se registran en absorbancia frente al blanco correspondiente para cada uno de los diferentes pHs y en presencia de cada una de las sales de amonio cuaternario.

C.4.1.b. Determinación simultánea de clorofenoles aplicando un método directo CLS y espectrofotometría derivada

Siguiendo el procedimiento descrito en C.4.1.a. y bajo las siguientes condiciones:

- Sal de amonio cuaternario: nitrato de tetrabutilamonio (TBA).
- Disolución reguladora: $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ 0.01 M de pH 9.1

se prepararon 20 disoluciones de los compuestos puros en el rango de concentración entre 2 y 20 mg/L. Una vez registrado cada espectro en absorbancia, se

normalizó a 1 mg/L dividiendo por su correspondiente concentración. Aplicando el criterio Q de Dixon y la distribución t de Student se obtuvo el espectro medio, representativo de cada clorofenol a un nivel de confianza del 95%. Los espectros normalizados en 1ª derivada se obtienen derivando los correspondientes espectros en absorbancia.

La determinación de los diferentes clorofenoles en mezclas cuaternarias, ternarias y binarias se llevó a cabo aplicando un método de determinación multicomponente basado en la regresión clásica de mínimos cuadrados (CLS), en el intervalo de longitudes de onda 250-380 nm.

C.4.1.c. Determinación de clorofenoles mediante un método de calibración multivariante CLS y espectrofotometría derivada

Siguiendo el procedimiento descrito en C.4.1.a. y bajo las mismas condiciones del apartado C.4.1.b. se obtuvo el espectro derivado de 20 mezclas cuaternarias, seleccionadas de forma aleatoria, de los clorofenoles 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol, en el intervalo de concentración entre 3 y 15 mg/L. La matriz **K** de coeficientes de absortividad del espectro derivado se obtuvo a partir de dichas mezclas, mediante calibración multivariante CLS. A partir de esta matriz **K** se cuantificaron los diferentes clorofenoles en mezclas binarias, ternarias y cuaternarias.

C.4.1.d. Procedimiento de estimación del número mínimo de mezclas de calibración

Un diseño de 37 mezclas de clorofenoles generado aleatoriamente para el intervalo de concentración comprendido entre 0-15 mg/L, se dividió en seis

grupos de 5 mezclas y uno de 7 mezclas mediante la aplicación del método propuesto por Honigs y col. (525). Siguiendo el procedimiento descrito en C.4.1.a. y bajo las condiciones del apartado C.4.1.b., se obtuvo la matriz de calibración de los espectros derivados del primer grupo de 5 mezclas para el intervalo de longitudes de onda 220-380 nm. Con esta matriz de calibración se realizó una estimación del error estándar de predicción (SEP) sobre una serie de 14 mezclas de control (validación). Seguidamente se obtuvo una nueva matriz de calibración formada por las mezclas del primer grupo al que se le añadieron el segundo grupo de 5 mezclas, volviendo a calcularse el SEP sobre la misma serie de mezclas de validación. El experimento se repitió hasta que el valor de SEP se mantenía prácticamente invariable para cada clorofenol.

Este procedimiento se realizó para cada uno de los cinco métodos de calibración multivariante estudiados en este trabajo, CLS, ILS, KF, PCR y PLS.

C.4.1.e. Selección de las longitudes de onda para la determinación multivariante de clorofenoles

Sobre el conjunto de mezclas seleccionado según el procedimiento descrito anteriormente, se procedió a la selección de las longitudes de onda a utilizar en la determinación multivariante de los clorofenoles. Para ello se siguieron los criterios del número de condición ($\text{cond}(K)$) y de la relación señal-ruido (S/N) cuyos aspectos teóricos se comentan en el apartado A.7.5.

C.4.2. Método automático (FIA)

C.4.2.a. Determinación de clorofenoles mediante calibración multivariante por FIA y espectrofotometría derivada

Se utiliza un sistema FIA cuyo esquema se muestra en la figura 1. A la disolución portadora, disolución reguladora de Bórax a pH 9.1 con un caudal de 1.5 ml/min, se le inyectan 250 μ l de disoluciones que contienen entre 2.0-10.1 mg/L de clorofenoles. La muestra confluye, posteriormente, con la disolución de TBA de 1500 mg/L que lleva un caudal de 1.2 ml/min. La reacción progresa en un reactor de 30 cm de longitud y 0.3 mm de diámetro interno, y la mezcla resultante se extrae con cloroformo, introducido en el sistema mediante un frasco de desplazamiento, a una caudal de 0.6 ml/min. La transferencia de masa tiene lugar en un reactor de extracción de teflón de 130 cm de longitud y 0.3 mm de diámetro interno. La fase orgánica se separa de la acuosa mediante un separador de fases de membrana (S.F.), registrándose los espectros entre 200 y 430 nm a intervalos de 0.6 segundos y con tiempos de integración de 0.3 segundos. Tanto muestras como patrones se inyectaron por quintuplicado, obteniéndose el espectro medio correspondiente al máximo del pico FIA. Este espectro se deriva y se guarda para posteriores cálculos.

Para llevar a cabo la calibración multivariante, se generaron 50 mezclas de forma aleatoria, en el intervalo de concentración 0-10 mg/L y a seis niveles de concentración. Otras 36 mezclas igualmente generadas de forma aleatoria fueron utilizadas como mezclas de validación. Los métodos de calibración multivariante estudiados fueron el CLS, el ILS, el KF, el PCR y el PLS (PLS2). La capacidad de predicción de cada uno de los métodos fue valorada en función del valor obtenido del SEP, RPE y coeficiente de correlación (R^2), utilizando el número de condición (cond(K)) como criterio de selección del intervalo óptimo de longitudes de onda para llevar a cabo dicha determinación.

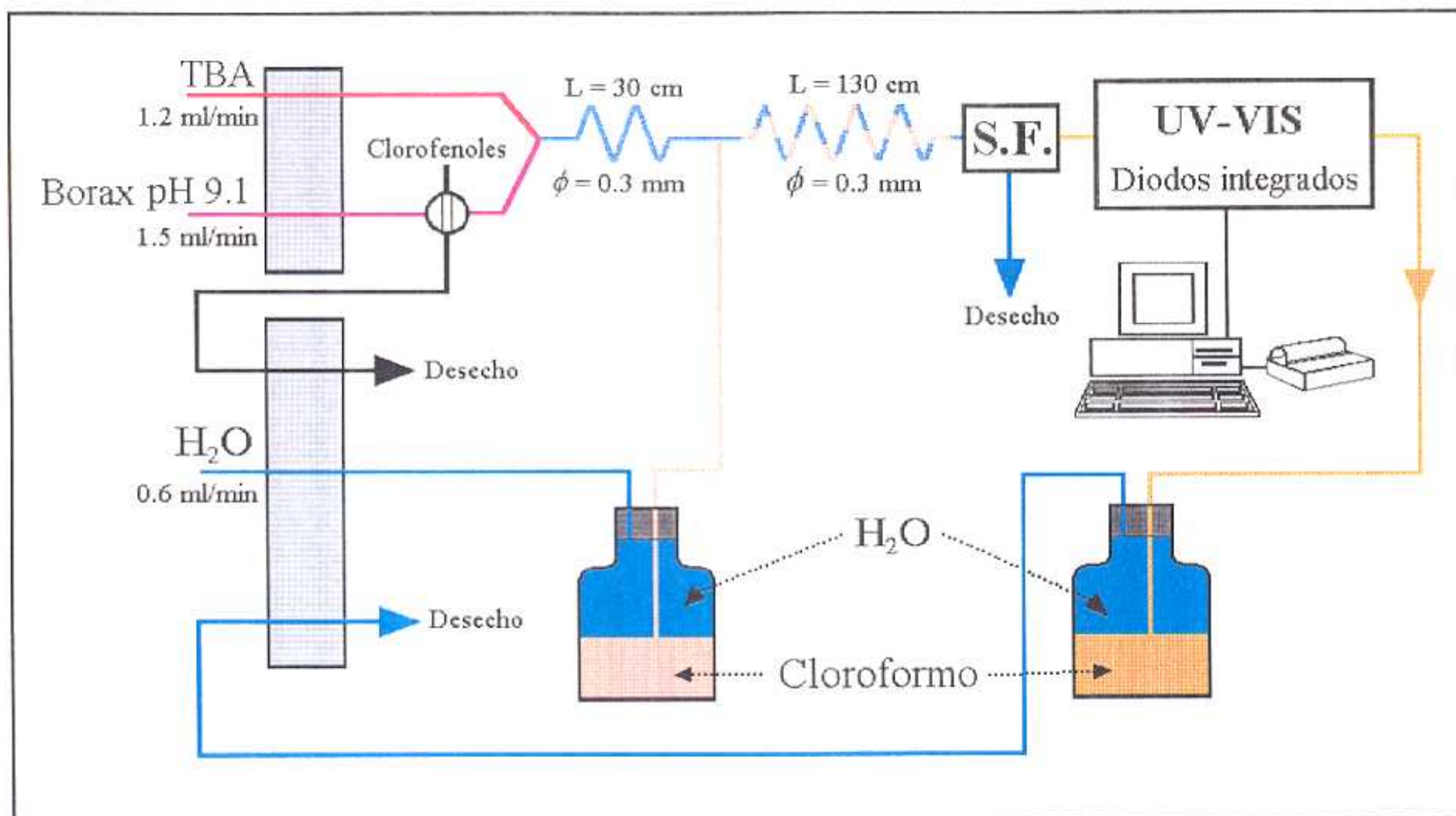


Fig. 1.- Esquema del sistema FIA para la determinación de clorofenoles mediante extracción líquido-líquido.

C.4.2.b. Determinación multivariante de clorofenoles en aguas

Un volumen de 500 ml de agua, que contenía clorofenoles en el intervalo de concentración 0-200 $\mu\text{g/L}$, fue previamente filtrado por papel de filtro y seguidamente a través de una membrana de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro. Tras adicionar 10 ml de HCl 3M, las muestras fueron preconcentradas mediante una resina XAD-4, la cual había sido previamente preparada, guardada y regenerada de acuerdo con el procedimiento descrito por Edgerton y col. (526) y que consta de los siguientes pasos:

- Lavado de la resina XAD-4 con HCl 3N, previamente extraído en hexano y tolueno. La operación se realizó mediante recirculación en un aparato Soxhlet durante 18 horas.
- Neutralización con NaOH 0.1 M y agua Milli Q.
- Extracción Soxhlet con metanol, acetonitrilo, acetona y hexano, sucesivamente, durante 8 horas para cada disolvente.
- Finalmente la resina es guardada en metanol en un frasco de vidrio.

Con esta resina se rellenó una columna de teflón de 60 x 5 mm de diámetro interno la cual contenía aproximadamente 1.2 g de dicha resina. La columna se guardó manteniendo metanol dentro de la misma.

Antes de ser utilizada la columna se acondicionó pasando a través de ella 10 ml de HCl 3M. Las muestras de agua fueron pasadas a través de la columna a un caudal de 4 ml/min y los clorofenoles fueron eluidos con 10 ml de metanol a un caudal de 2 ml/min. El metanol fue eliminado utilizando un rotavapor y los clorofenoles fueron disueltos en 10 ml de la disolución reguladora de bórico/borato utilizada de portador en el sistema FIA.

Las muestras así obtenidas fueron inyectadas en el sistema FIA descrito en el apartado C.4.2.a. y la determinación de cada clorofenol fue llevada a cabo aplicando los métodos de calibración multivariante descritos en dicho apartado.

C.4.2.c. Determinación multivariante de clorofenoles en orina

Un volumen de 50 ml de orina que contenía entre 0.2-1.0 mg/L de clorofenoles fue sometido a un proceso de hidrólisis básica, mediante la adición de 5 ml de NaOH 10 M, calentando a reflujo durante 1 hora. Posteriormente se dejó enfriar la muestra y se llevó a cabo un primer proceso de extracción líquido-líquido con 15 ml de tetracloruro de carbono (3 porciones de 5 ml). La fase orgánica se desechó mientras que la fase acuosa fue neutralizada y acidificada adicionando 5 ml de HCl concentrado. Se lleva a cabo entonces un segundo proceso de extracción líquido-líquido con 15 ml de tetracloruro de carbono (3 porciones de 5 ml). La fase acuosa es desechada mientras que la fase orgánica, una vez secada con Na_2SO_4 anhidro, es sometida a un proceso de evaporación en un dispositivo de Kuderna-Danish. Los clorofenoles son finalmente disueltos en 5 ml de la disolución reguladora bórico/borato utilizada de portador en el sistema FIA. En la figura 2 se muestra el esquema de la preparación de las muestras de orina.

La determinación multivariante de los clorofenoles en orina se realizó a partir del mismo diseño de calibración empleado en el análisis de agua, pero al que se le añadieron 10 mezclas que contenían orina liofilizada con diferentes cantidades de clorofenoles para, de este modo, modelar en el sistema multivariante el efecto matriz de los componentes naturales de la orina.

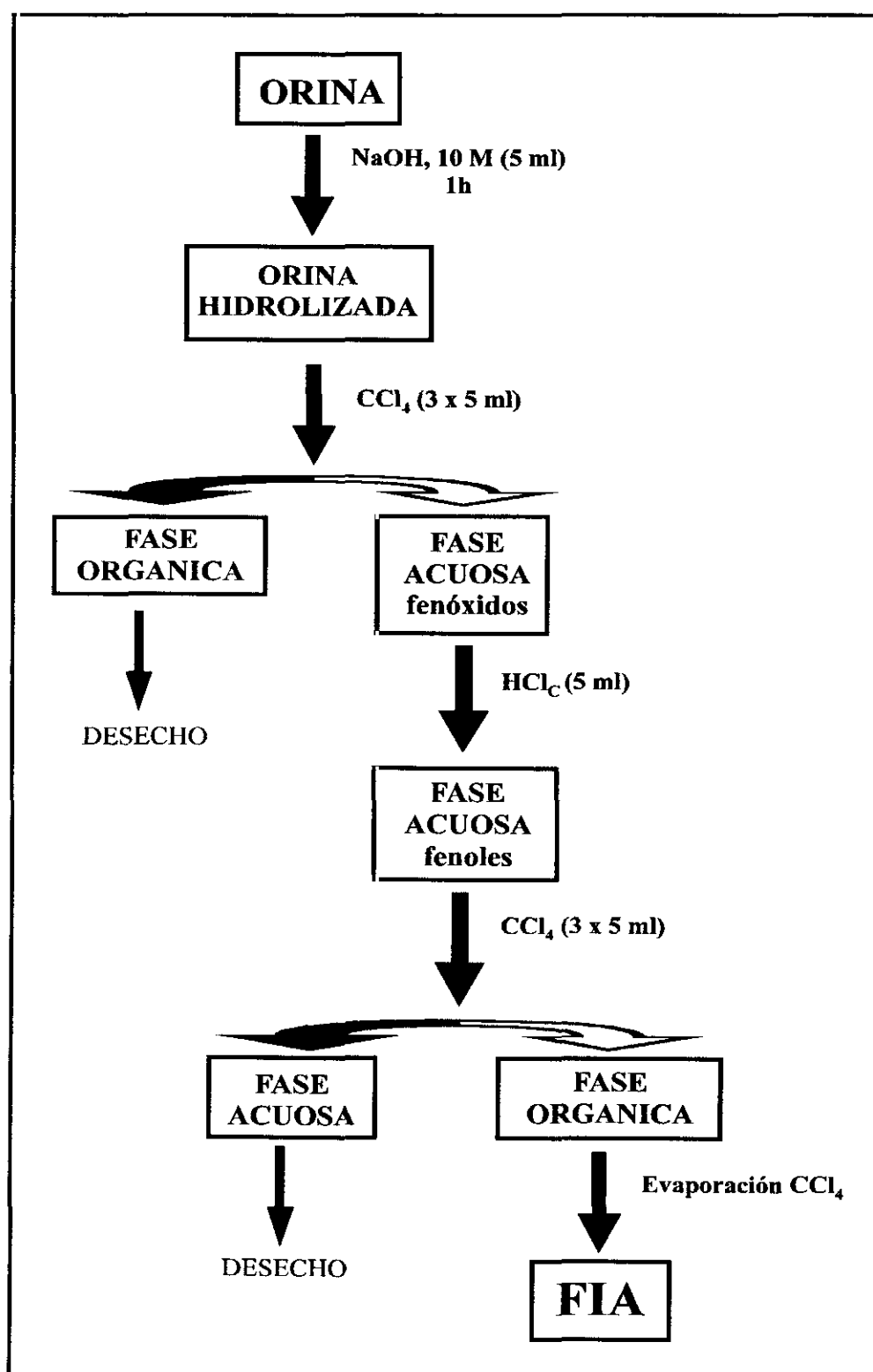


Fig. 2.- Esquema de preparación de las muestras de orina.

D. RESULTADOS y DISCUSIÓN

D.1. MÉTODO MANUAL

D.1.1. Estudio extractivo-espectrofotométrico de los clorofenoles en presencia de sales de amonio cuaternario

D.1.1.a. Influencia de la naturaleza de la sal de amonio cuaternario y del pH

Siguiendo el procedimiento descrito en C.4.1.a., se llevó a cabo el estudio de la influencia de cinco sales de amonio cuaternario de diferente tamaño molecular, sobre la extracción de cinco clorofenoles considerados contaminantes prioritarios por la USEPA. El estudio se realizó tanto a pH ácido como básico (<2, 4.7, 6.4, 9.1, y >10).

A continuación se exponen los resultados obtenidos para cada uno de los clorofenoles estudiados.

D.1.1.a.1. 2-clorofenol

Se ha estudiado el efecto de las distintas sales de amonio cuaternario sobre el espectro de absorción del 2-clorofenol extraído a diferentes pHs.

Con la sal de amonio cuaternaria más voluminosa, Hy-3500, forma emulsiones difíciles de romper a pH ácidos, dando lugar a resultados poco reproducibles. A pHs intermedios el espectro del 2-clorofenol presenta una banda con un máximo de absorción a 264 nm, mientras que a pHs superiores a 10 aparecen dos bandas correspondientes al par iónico con dos máximos a 260 y 308 nm (Fig. 3).

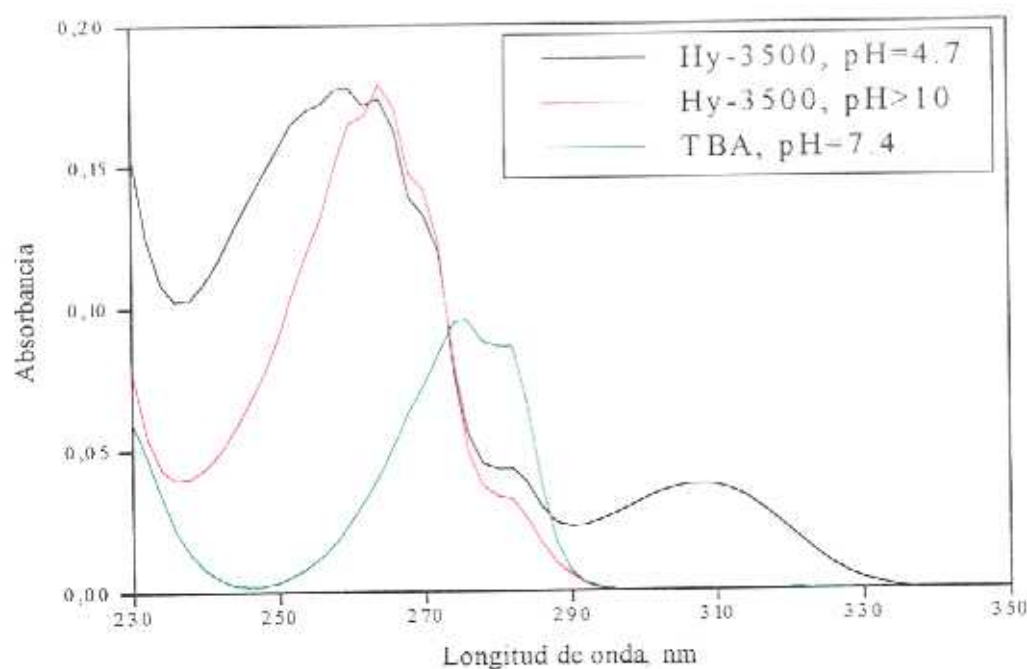


Fig. 3.- Influencia de la sal de amonio cuaternario y del pH en la extracción del 2-clorofenol.

En el caso del CTAB y al igual que con la Hy-3500, se forman emulsiones a pH ácidos, siendo prácticamente imposible la separación de ambas fases a $\text{pH} < 2$. A pHs inferiores a 10 el espectro del 2-clorofenol presenta una banda con máximo a 276 nm y un hombro en 282 nm correspondiente a la extracción del compuesto en forma ácida. Igual ocurre con el resto de las sales de amonio cuaternario de menor peso molecular; TBA, TPA y TMA, no observándose, por consiguiente, en ningún caso las bandas características de la extracción del par iónico. En la figura 3 se muestra el espectro característico de la extracción del 2-clorofenol en forma ácida en presencia de TBA a pH 7.4, el cual es similar al obtenido en presencia de CTAB, TPA y TMA.

A $\text{pH} > 10$ el 2-clorofenol no se extrae en presencia de CTAB, TBA, TPA y TMA debido a que el equilibrio está muy desplazado hacia la forma básica (fenóxido) ($\text{pK}_a = 8.48$).

D.1.1.a.2. 4-cloro-3-metilfenol

En este caso el estudio ha revelado que el 4-cloro-3-metilfenol no se extrae como par iónico en presencia de las diferentes sales de amonio cuaternario y a ningún pH, extrayéndose en todos los casos en la forma fenol, presentando una banda con un máximo de absorción a 282 nm (Fig. 4). El hecho de que el fenol se extraiga como tal, y no como fenóxido, formando pares iónicos puede ser debido a las propiedades superficiales de las sales de amonio cuaternario, que favorecen la extracción de la forma neutra de los clorofenoles. A pH muy ácidos y con las sales de amonio cuaternario muy voluminosas se forman emulsiones difíciles de romper, siendo prácticamente imposible la separación de ambas fases.

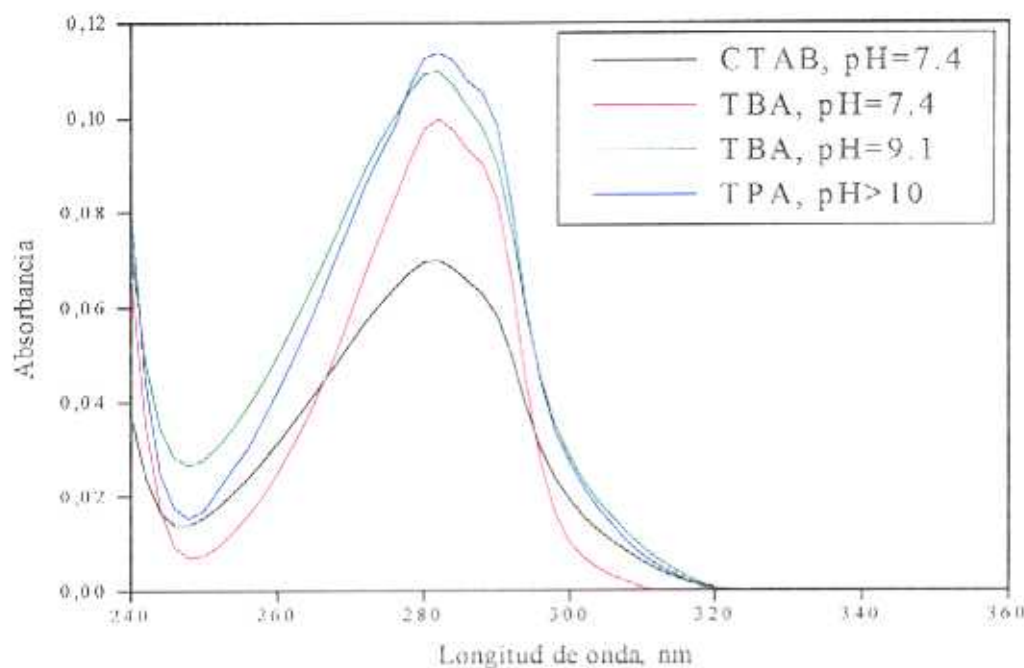


Fig. 4 - Influencia de la sal de amonio cuaternario y del pH en la extracción del 4-cloro-3-metilfenol.

D.1.1.a.3. 2,4-diclorofenol

En presencia de Hy-3500 y a pH 4,7, el 2,4-diclorofenol se extrae en forma neutra, presentando el espectro una banda con un máximo de absorción a 286 nm y un hombro a 294 nm. A pH 7,4 y superiores, este clorofenol se extrae parte en forma neutra y parte en forma de par iónico presentando el espectro, en este último caso, dos bandas con máximos a 254 y 322 nm. A medida que aumenta el pH la banda correspondiente a la extracción neutra va desapareciendo extrayéndose únicamente como par iónico.

El 2,4-diclorofenol presenta un comportamiento prácticamente similar en presencia de CTAB aunque la extracción del par iónico a pH 7,4 y superiores tiene lugar en menor grado con respecto al obtenido en presencia de Hy-3500. Esto es debido posiblemente a que al ser el CTAB, un contraión de menor

tamaño que la Hy-3500, se encuentra menos favorecida la formación y/o extracción del par iónico.

Los espectros del 2,4-diclorofenol en presencia de TBA y a pH 9.1 y superiores presentan también las bandas de absorción características del par iónico, siendo estas de muy pequeña intensidad. A pH inferiores a 9.1 en presencia de TBA se extrae en la forma neutra.

En presencia de TPA y TMA y a pHs inferiores a 10 debido a su pequeño tamaño molecular el 2,4-diclorofenol no se extrae en forma de par iónico observándose únicamente la banda correspondiente a la extracción de la forma neutra. A $\text{pH} > 10$ no se extrae prácticamente nada al estar el equilibrio muy desplazado hacia la forma iónica (fenóxido) ($\text{pK}_a = 7.85$).

En la figura 5 se muestran los espectros más característicos obtenidos en la extracción del 2,4-diclorofenol en presencia de diferentes sales de amonio cuaternario y a diferentes pHs. El espectro obtenido con Hy-3500 a pH 4.7 corresponde a la extracción de la forma neutra, el cual es muy similar al obtenido en presencia de TPA y TMA a pHs inferiores a 10, en presencia de TBA a pHs inferiores a 9.1, o en presencia de CTAB a pHs inferiores a 7.4.

D.1.1.a.4. 2,4,6-triclorofenol

En presencia de Hy-3500 el 2,4,6-triclorofenol se extrae conjuntamente en forma neutra y en forma de par iónico a partir de pH 4.7, siendo las bandas de absorción del par iónico más intensas a medida que aumenta el pH. a $\text{pH} < 2$ se extrae en forma neutra. El comportamiento en presencia de CTAB es similar al obtenido con la Hy-3500.

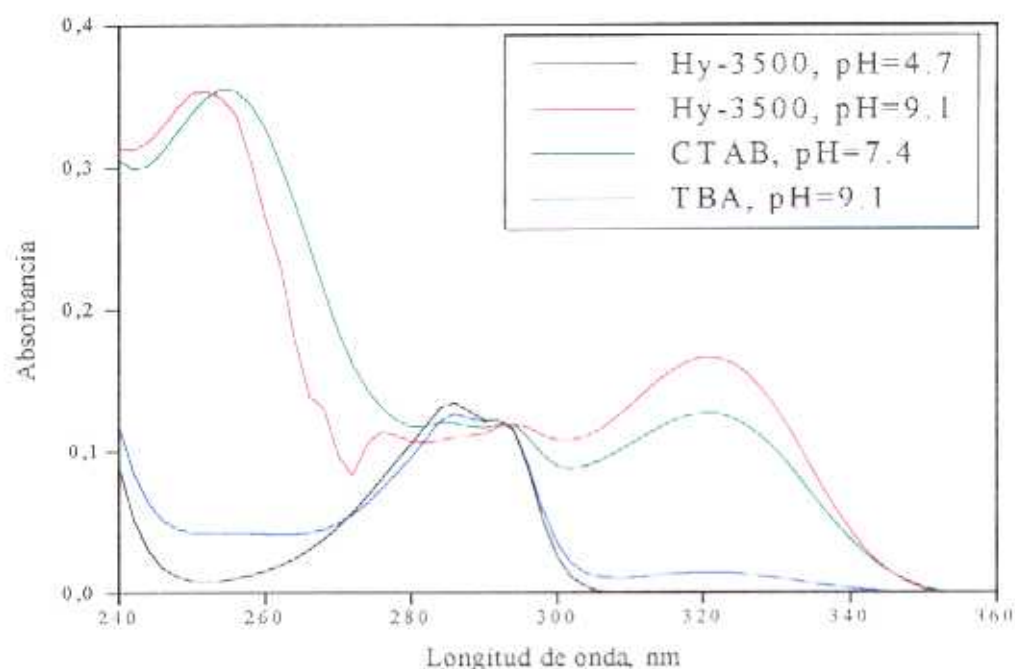


Fig. 5 - Influencia de la sal de amonio cuaternario y del pH en la extracción del 2,4-diclorofenol.

El espectro obtenido en la extracción de la forma neutra del 2,4,6-triclorofenol presenta una banda con dos máximos de absorción a 288 y 296 nm, mientras que el espectro de extracción del par iónico presenta dos bandas con máximos a 258 y 330 nm.

Cuando se utiliza el TBA como contraión se observa que a partir de pH 7.4 se extraen conjuntamente la forma neutra y el par iónico estando el espectro formado por las bandas típicas de ambas formas. Al igual que antes, este clorofenol se extrae más como par iónico a medida que aumenta el pH, extrayéndose únicamente como tal a $\text{pH} > 10$. Igual sucede en presencia de TPA aunque el par iónico se forma en menor grado debido al menor tamaño molecular del TPA con respecto al TBA.

El espectro de absorción del 2,4,6-triclorofenol no se ve modificado en presencia de la sal de amonio cuaternario de menor tamaño estudiada, TMA, a ninguno de los diferentes pHs estudiados, no extrayéndose en ningún caso el par iónico. No obstante, a $\text{pH} > 10$ la extracción de este es prácticamente nula al estar el equilibrio, al igual que los anteriores clorofenoles, muy desplazado hacia la forma iónica ($\text{pK}_a = 6.00$).

En la figura 6 se muestran los espectros más característicos obtenidos utilizando las diferentes sales de amonio cuaternario. El espectro obtenido en presencia TMA a pH 7.4 corresponde a la extracción de la forma neutra del fenol, mientras que el espectro obtenido en presencia de Hy-3500 a $\text{pH} > 10$ corresponde a la extracción del par iónico formado. El resto de los espectros presentados corresponden a la extracción conjunta de ambas formas.

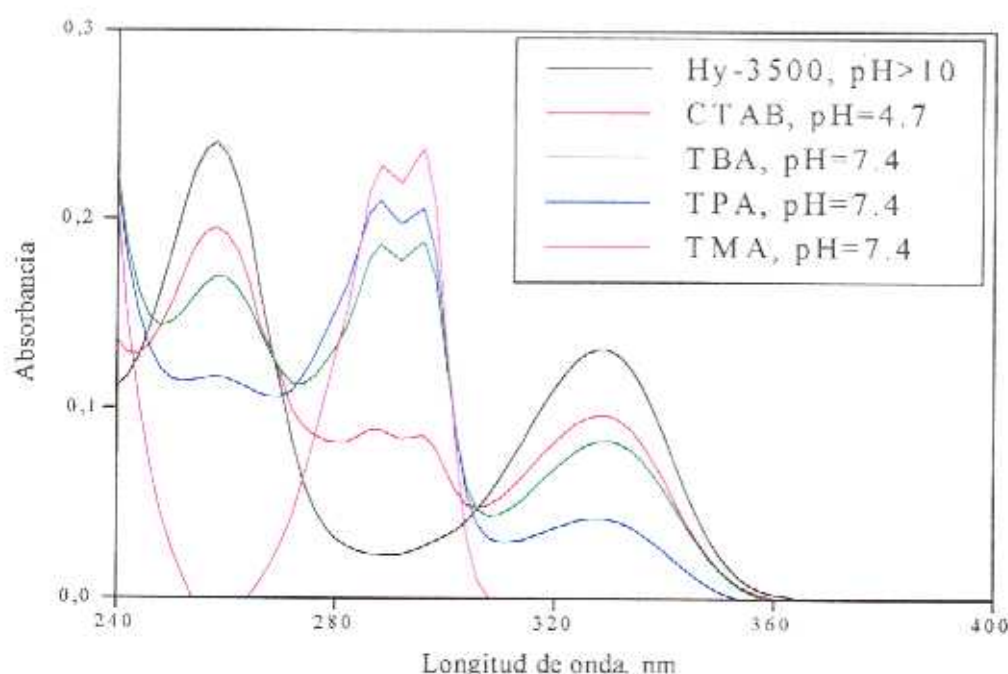


Fig. 6. - Influencia de la sal de amonio cuaternario y del pH en la extracción del 2,4,6-triclorofenol.

D.1.1.a.5. Pentaclorofenol

Para este clorofenol se observó, que en presencia de Hy-3500, la extracción del par iónico tiene lugar a partir de pH 4.7. En dicha extracción, y a ese pH, tiene también lugar la extracción de la forma neutra del pentaclorofenol, la cual es cada vez menor a medida que aumenta el pH, siendo esta desplazada por la extracción del par iónico. Este comportamiento es similar en presencia de CTAB. A $\text{pH} < 2$, y al igual que en los anteriores casos, ambas sales de amonio cuaternario dan lugar a emulsiones que hacen difícil la separación de las dos fases.

El espectro obtenido en la extracción de la forma neutra del pentaclorofenol presenta una banda con un máximo de absorción a 304 nm, mientras que el espectro de extracción del par iónico presenta dos bandas con máximos a 264 y 336 nm.

Las sales de amonio cuaternario TBA y TPA presentan un comportamiento similar entre ellas. A $\text{pH} < 2$ no se forma el par iónico extrayéndose únicamente la forma neutra. A pH 4.7 tiene lugar la extracción de ambas formas (neutra y par iónico) lo cual viene indicado por la presencia de tres bandas en el espectro, la correspondiente a la extracción de la forma neutra (304 nm) y las correspondientes a la extracción del par iónico (264 y 336 nm). A partir de pH 7.4 únicamente se observan las bandas correspondientes a la extracción del par iónico.

El pentaclorofenol en presencia de TMA no se extrae en forma de par iónico a ninguno de los pHs estudiados, siendo a partir de pH 7.4 prácticamente nula la extracción del fenol al estar muy desplazado el equilibrio hacia la forma iónica ($\text{pK}_a = 5.25$).

En resumen, el pentaclorofenol es, de los clorofenoles estudiados, el que presenta una mayor capacidad de formación de pares iónicos en presencia de sales de amonio cuaternario de tamaño molecular adecuado y en un amplio margen de pHs.

En la figura 7 se muestran los espectros más característicos obtenidos para este fenol en función del pH y las diferentes sales de amonio cuaternario. El espectro obtenido en presencia TMA a pH 7.4 corresponde a la extracción de la forma neutra del fenol, mientras que el espectro obtenido en presencia de Hy-3500 a pH 9.1 corresponde a la extracción del par iónico formado. El resto de los espectros presentados corresponden a la extracción conjunta de ambas formas.

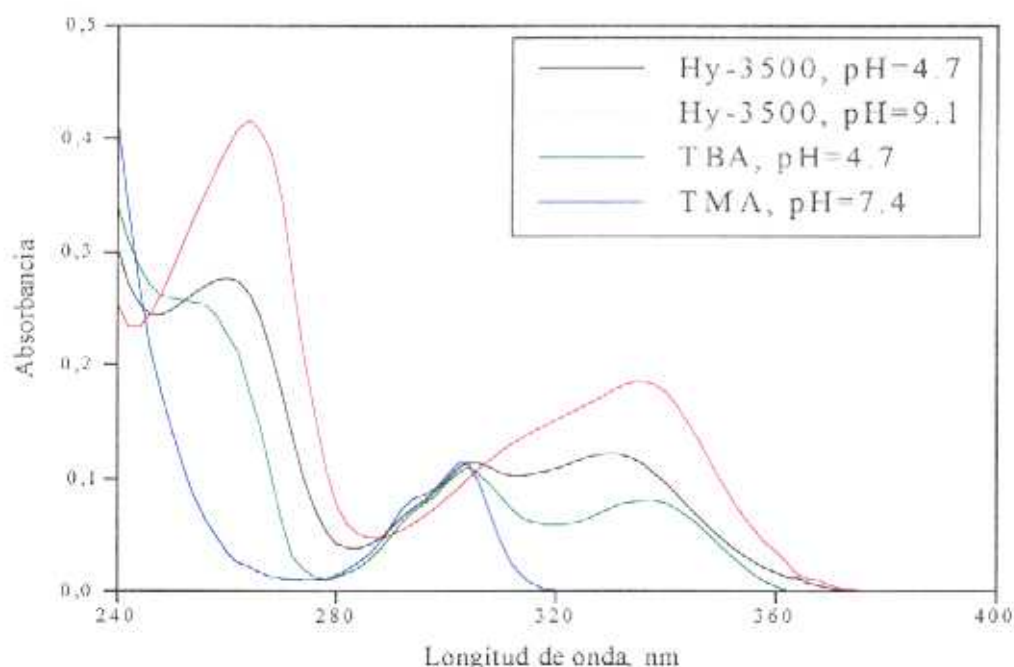


Fig. 7.- Influencia de la sal de amonio cuaternario y del pH en la extracción del pentaclorofenol.

En general se puede decir que la capacidad de formación y extracción de pares iónicos de los clorofenoles aumenta con el grado de cloración de estos lo cual está directamente relacionado con la constante de acidez de cada uno de ellos. Otro efecto observado, es que la presencia de sales de amonio cuaternario favorece la extracción de los fenoles en forma neutra aun a pHs superiores a su pKa debido

posiblemente a cambios en la tensión superficial, siendo este efecto independiente del tamaño de la sal de amonio cuaternario.

D.1.1.b. Influencia del disolvente orgánico

A partir de los resultados obtenidos en el estudio extractivo-espectrofotométrico del apartado D.1.1.a. se buscaron las condiciones más adecuadas de pH y sal de amonio cuaternario que dieran lugar a espectros de absorción molecular lo más diferenciados posible, para de esta forma poder acometer mejor la determinación multicomponente de los fenoles 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol. A pH 9.1 y utilizando TBA como sal de amonio cuaternario solo el 2,4,6-triclorofenol y el pentaclorofenol se extraen en forma de par iónico, mientras que los otros tres clorofenoles se extraen mayoritariamente en la forma neutra (figura 8).

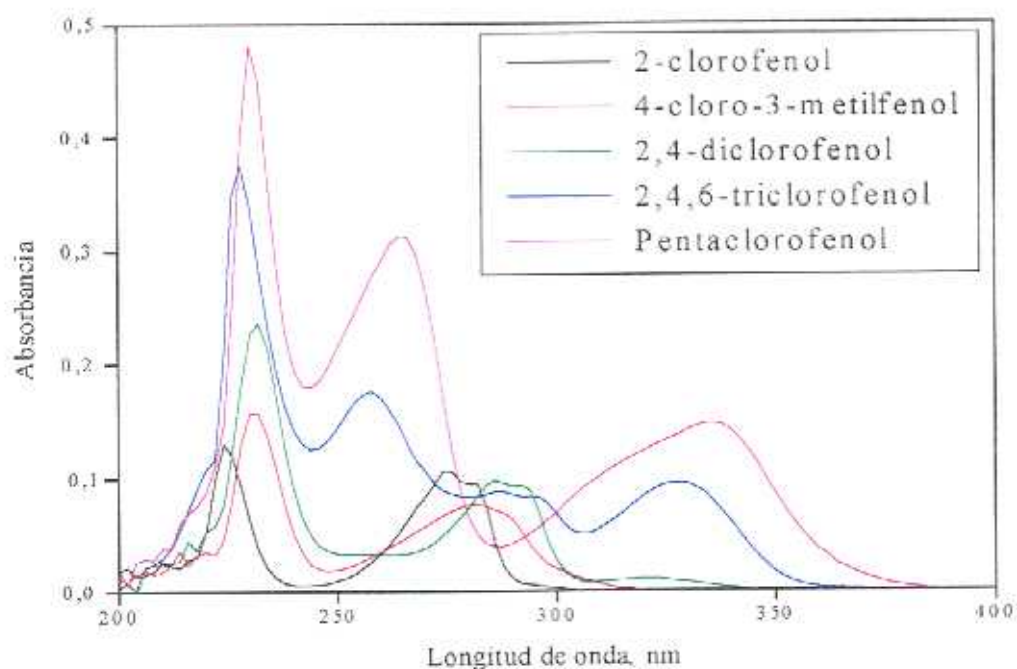


Fig. 8.- Espectros de extracción de los clorofenoles en las condiciones seleccionadas (sal de amonio cuaternario: TBA, pH 9.1).

Se estudió posteriormente la influencia del disolvente orgánico sobre la extracción de los diferentes clorofenoles. Siguiendo el procedimiento descrito en C.4.1.a., se estudiaron tres disolventes orgánicos como son: el tetracloruro de carbono (CCl_4), el 1,2-dicloroetano y el cloroformo (CHCl_3).

Se consideró como parámetro representativo de cada uno de los disolventes el parámetro E_T^N de Dimroth-Reichardt. El E_T^N de un disolvente es un parámetro que tiene en cuenta las diferentes características físico-químicas del mismo que incluyen polaridad, constante dieléctrica, etc. (527). En el caso de los disolventes estudiados, el E_T^N toma los valores 0.327, 0.256 y 0.052 para el 1,2-dicloroetano, cloroformo y tetracloruro de carbono, respectivamente.

En las figuras 9 y 10 se representa la absorbancia de cada clorofenol (10 mg/L), en el máximo de la banda de absorción, frente al E_T^N de cada uno de los disolventes estudiados. Como se puede observar la extracción de la forma neutra del 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol y 2,4-diclorofenol no está afectada por ningún disolvente (figura 9), mientras que sí influye en la extracción del par iónico del 2,4,6-triclorofenol y del pentaclorofenol (Fig. 10). En estos dos últimos casos se observa una disminución de la absorbancia al utilizar el CCl_4 ($E_T^N=0.052$), mientras que los resultados obtenidos utilizando CHCl_3 ($E_T^N=0.256$), y 1,2-dicloroetano ($E_T^N=0.327$), no presentan diferencias importantes. Se eligió el CHCl_3 como disolvente orgánico de extracción al ser un disolvente muy usual en los laboratorios analíticos.

Como en las condiciones de trabajo, el 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol y 2,4-diclorofenol se extraen en la forma neutra, mientras que el 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol se extraen como fenóxidos formando pares iónicos, cabe concluir que el disolvente empleado puede influir de forma importante sobre la formación y el rendimiento de la extracción del par iónico.

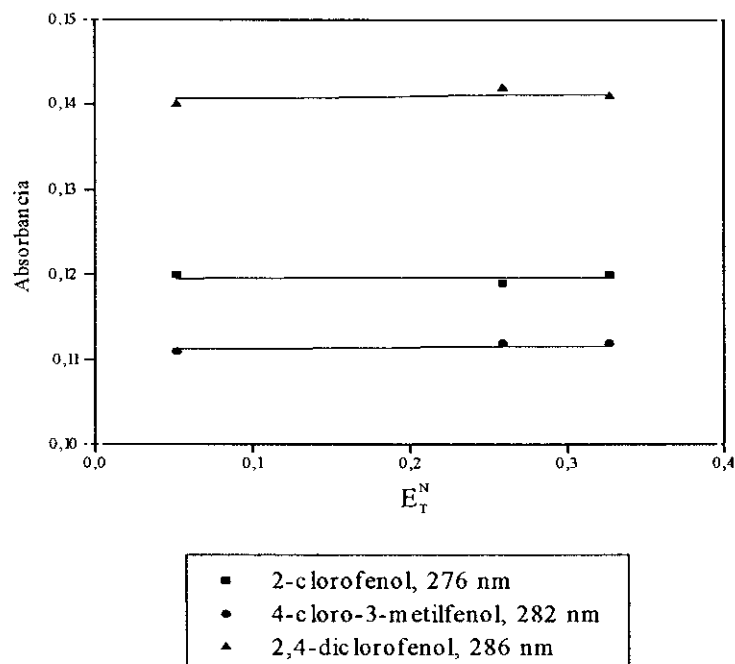


Fig. 9.- Variación de la absorbancia del 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol y 2,4-diclorofenol en función del E_T^N de cada disolvente.

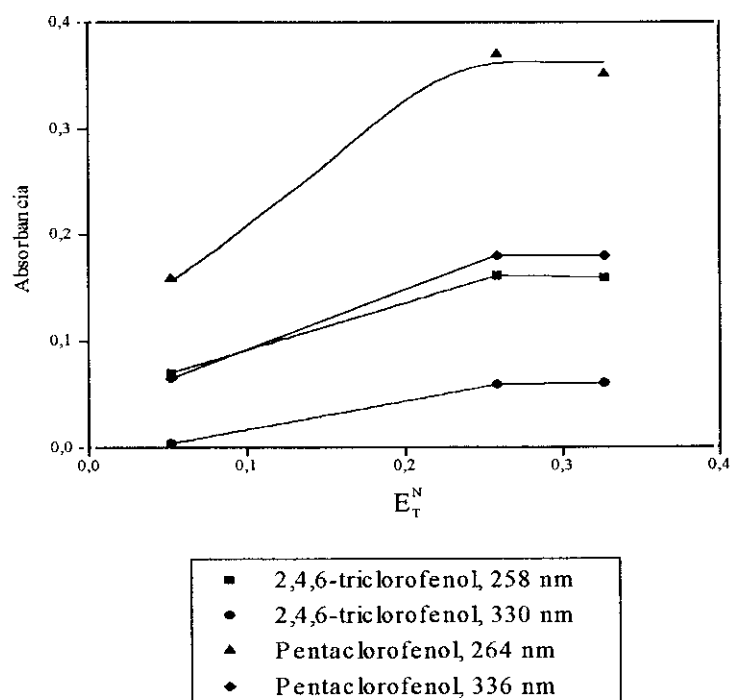
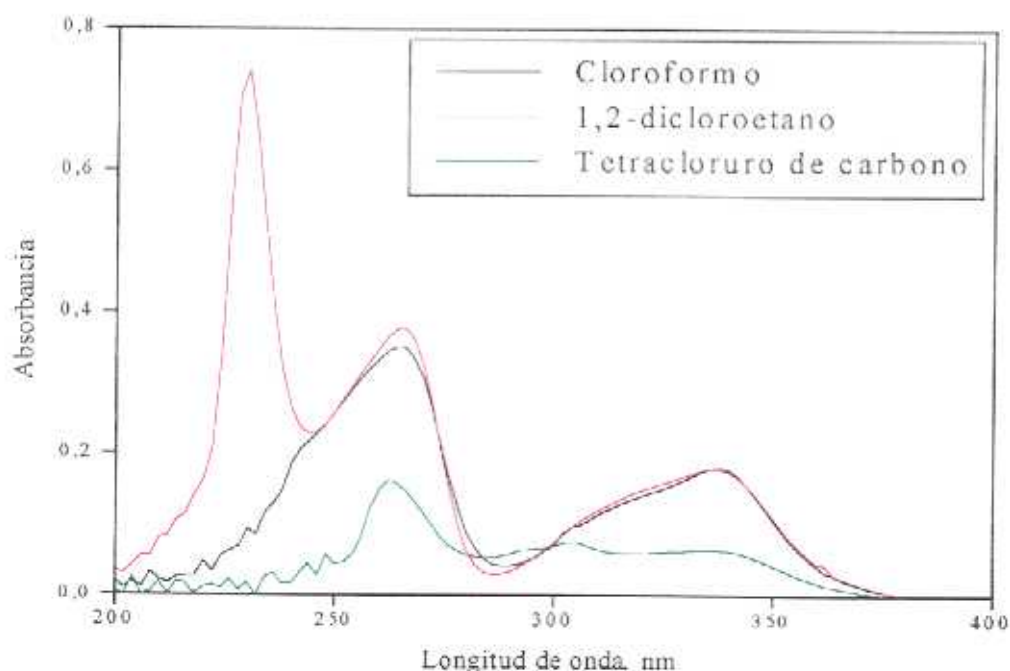


Fig. 10.- Variación de la absorbancia del 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol en función del E_T^N de cada disolvente.

La figura 11 muestra los espectros obtenidos al extraer, con cada uno de los disolventes, el par iónico pentaclorofenol-TBA a pH 9.1 donde se observa, con excepción de la banda de 230 nm, que tanto en cloroformo como en 1,2-dicloroetano, se obtienen espectros muy similares. La banda a 230 nm, que únicamente se observa cuando la extracción se realiza en 1,2-dicloroetano, suele ser bastante irreproducible, posiblemente por la influencia que sobre esta zona del espectro tienen pequeñas variaciones en la composición del blanco utilizado como referencia en la medida espectrofotométrica.



pH = 9,1

Sal de amonio cuaternario: TBA

Fig. 11.- Influencia del disolvente orgánico en la extracción del par iónico pentaclorofenol-TBA.

D.1.1.c. Influencia de la concentración de TBA

Otro parámetro que se ha estudiado, ha sido la influencia de la concentración de TBA sobre la extracción de cada clorofenol. Para ello se ha utilizado una concentración de TBA comprendida entre 100 y 1500 mg/L, siguiendo el procedimiento descrito en C.4.1.a. La concentración de clorofenol en todos los casos se fijó 10 mg/L.

En la figura 12 se representa la variación de la absorbancia de cada uno de los clorofenoles con respecto a la concentración de TBA. Como puede observarse dicha absorbancia aumenta con la concentración de TBA hasta 300 mg/L a partir de la cual alcanza un valor prácticamente constante. Por lo tanto, cuando la concentración de clorofenol es de 10 mg/L es suficiente con 300 mg/L de la sal de amonio cuaternario para conseguir la máxima señal analítica. Sin embargo, se fijó como concentración óptima 500 mg/L para asegurar la formación del par iónico tanto a concentraciones más altas de clorofenol como en presencia de otros clorofenoles.

Como conclusión de estos estudios previos realizados para la determinación extractivo-espectrofotométrica de los clorofenoles contaminantes prioritarios 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol, se puede decir que los mejores resultados en cuanto a extracción, reproducibilidad y estabilidad se obtienen extrayendo en cloroformo y utilizando como contraión TBA a pH 9.1. La tabla VIII muestra un resumen de estas variables estudiadas así como los valores finales seleccionados para estudios posteriores.

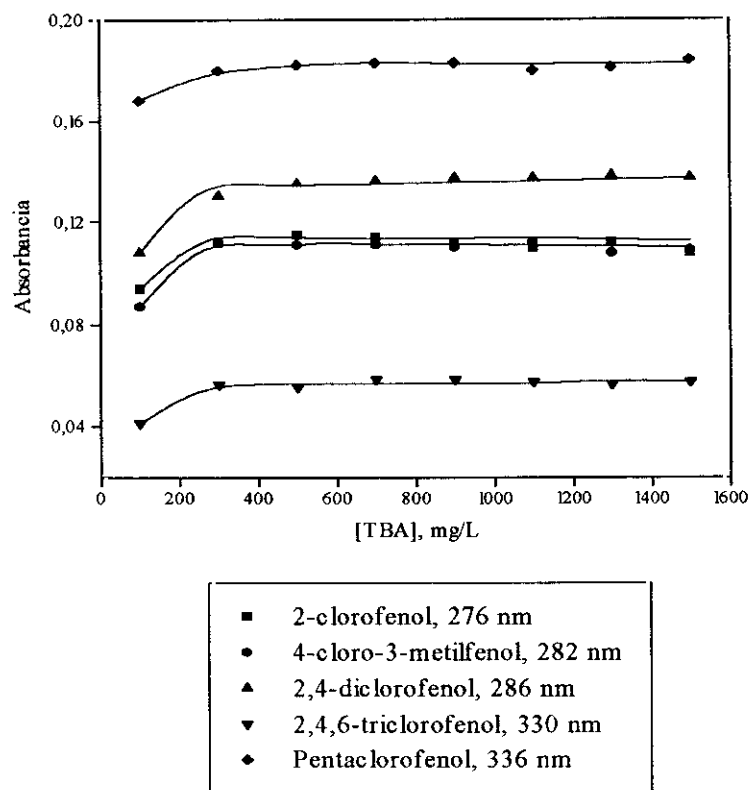


Fig. 12.- Influencia de la concentración de TBA en la extracción de cada clorofenol.

TABLA XIV. Condiciones experimentales seleccionadas. Método manual.

Variable	Intervalo	Seleccionado
pH	2-10	9.1
Sal de amonio cuaternario	Hy-3500 CTAB TBA TPA TMA	TBA
[TBA], mg/L	100-1500	500
Disolvente orgánico	1,2-dicloroetano Cloroformo Tetracloruro de carbono	Cloroformo

D.1.2. Determinación simultánea de clorofenoles mediante un método directo de regresión lineal clásica de mínimos cuadrados (CLS)

Una vez fijadas las condiciones de extracción de los distintos clorofenoles, se procedió a la determinación de cada uno de ellos mediante un método directo CLS.

D.1.2.a. Normalización de espectros

La utilización de un método directo, hace referencia al hecho de que los espectros normalizados de cada componente, que se utilizan para la obtención de la matriz de calibración (**K**), son obtenidos a partir de cada uno de los componentes en estado puro. Para ello, en este caso, se obtuvieron para cada componente los correspondientes espectros en el intervalo lineal de 2 a 20 mg/L con una variación de 2 mg/L. Cada una de las disoluciones se preparó por duplicado lo que representan veinte espectros por cada componente. Posteriormente se normalizaron los espectros a 1 mg/L dividiendo cada espectro por su correspondiente concentración y corrigiendo la línea base a absorbancia cero.

Para obtener el espectro representativo de cada clorofenol se aplicó el criterio **Q** de Dixon y la distribución *t* de Student a un nivel de confianza del 95% para excluir aquellos espectros que más se desviaban del espectro medio. De esta forma se obtuvieron los espectros del 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y el pentaclorofenol representados en la figura 13.

Los espectros obtenidos para estos clorofenoles eran muy reproducibles, no así el 2,4,6-triclorofenol, que no presentó espectros reproducibles en las condiciones de trabajo seleccionadas, por lo que no se incluyó en posteriores estudios.

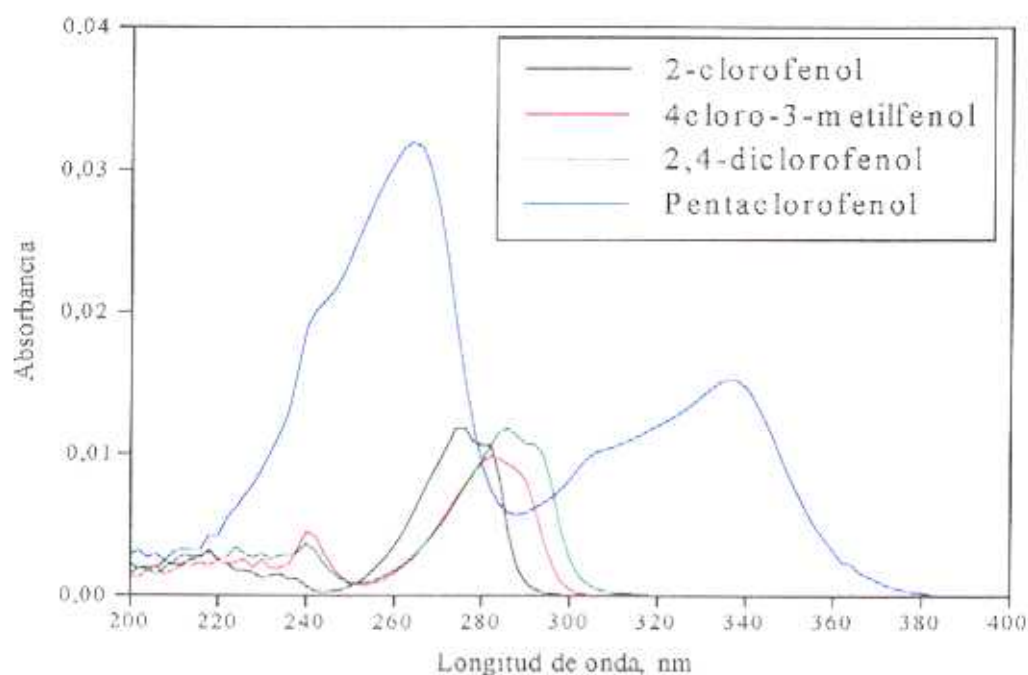
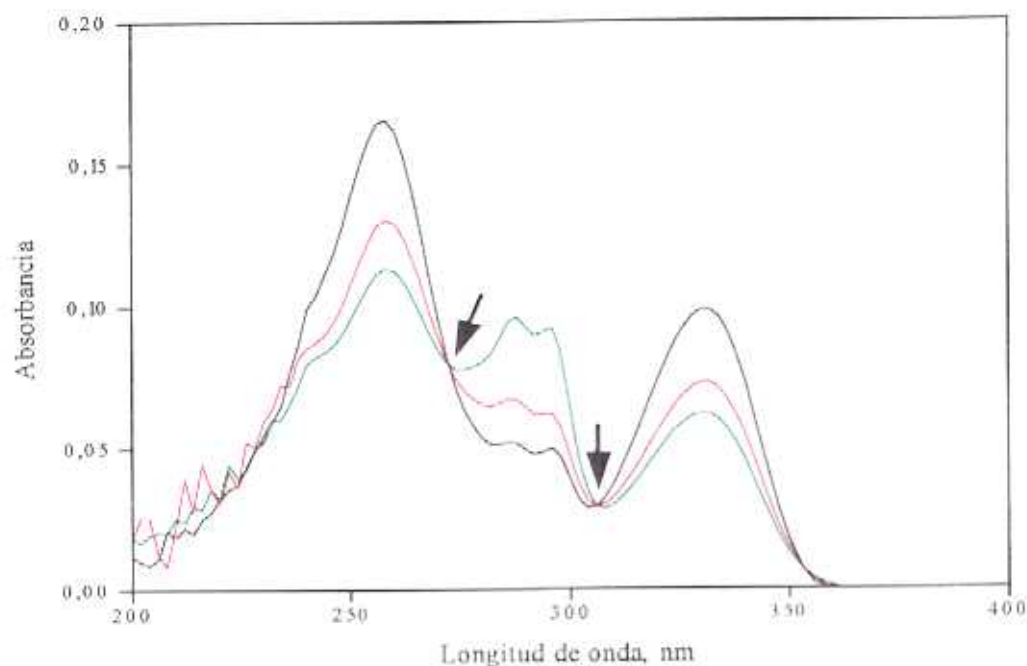


Fig. 13.- Espectros patrón normalizados a 1 mg/L de cada clorofenol obtenidos mediante calibración univariante.

La figura 14 muestra los espectros obtenidos en diferentes días para una misma concentración de 2,4,6-triclorofenol y bajo las mismas condiciones químicas. Como puede observarse el espectro, además de las dos bandas características del par iónico (258 y 330 nm), presenta en ocasiones la banda correspondiente a la extracción del fenol en su forma neutra (288 nm) por lo que en estas condiciones se extraen ambas formas en equilibrio, conclusión esta que viene corroborada por la presencia de dos puntos isobésticos. Se estudió la influencia de la temperatura observándose que la forma del espectro no estaba afectada en gran medida por esta, por lo que las variaciones de dicho espectro pueden ser debidas a alguna variable química no del todo controlada, o la propia cinética de extracción del par iónico, que sea excesivamente lenta.



pH = 9,1

Sal de amonio cuaternario: TBA

Fig. 14.- Variación del espectro de absorción del 2,4,6-triclorofenol debido a variaciones aleatorias de las condiciones experimentales.

D.1.2.b. Elección del orden de derivada

Una vez obtenidos los espectros normalizados del 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol se procedió a estudiar la influencia del orden de derivada sobre los resultados finales de predicción. Para lo cual se calculó, para cada clorofenol, tanto el error relativo de predicción (RPE) como la desviación estándar de predicción (SEP) utilizando para ello un diseño aleatorio de veinte mezclas cuaternarias de predicción (Tabla IX) así como la derivada de orden cero (absorbancia) y la primera derivada. El intervalo de longitudes de onda utilizado fue 230-400 nm en ambos casos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla X.

TABLA IX. Composición de las mezclas cuaternarias utilizadas para evaluar la capacidad predictiva del método directo CLS (mg/L).

Mezcla	2CF	4C3MF	DCF	PCF
1	15.0	11.0	7.0	3.0
2	15.0	7.0	3.0	7.0
3	11.0	13.0	15.0	13.0
4	7.0	5.0	3.0	5.0
5	3.0	11.0	13.0	5.0
6	13.0	9.0	7.0	15.0
7	15.0	15.0	9.0	7.0
8	5.0	3.0	13.0	15.0
9	15.0	7.0	7.0	15.0
10	11.0	5.0	11.0	13.0
11	7.0	5.0	15.0	15.0
12	5.0	11.0	3.0	9.0
13	3.0	11.0	9.0	13.0
14	7.0	7.0	9.0	9.0
15	15.0	7.0	9.0	9.0
16	9.0	11.0	9.0	5.0
17	9.0	11.0	13.0	7.0
18	11.0	3.0	3.0	5.0
19	13.0	9.0	9.0	5.0
20	3.0	5.0	9.0	15.0

TABLA X. RPE(%) y SEP (mg/L) para cada clorofenol en Absorbancia y 1ª Derivada.

Clorofenol	Absorbancia		1ª Derivada	
	RPE	SEP	RPE	SEP
2-clorofenol	34.3	7.5	23.4	5.1
4-cloro-3-metilfenol	65.9	11.4	28.8	5.0
2,4-diclorofenol	40.7	7.6	9.9	1.8
Pentaclorofenol	19.6	3.6	16.6	3.1

Como se puede observar en esta tabla, se obtienen valores de RPE y SEP menores cuando se utiliza los espectros en primera derivada. El hecho de que el orden de la derivada influya en la precisión y exactitud del método ha sido igualmente puesto de manifiesto por varios autores, como ya se ha comentado en la revisión bibliográfica. En este sentido, diferentes factores tanto de origen instrumental (deriva de la línea base) como químico (concentración del analito) pueden afectar al resultado dependiendo del orden de la derivada.

Como consecuencia de esto se eligió la derivada de primer orden para el posteriores estudios de análisis de clorofenoles en diferentes mezclas.

D.1.2.c. Selección del intervalo de longitudes de onda.

Se estudiaron diferentes intervalos de longitudes de onda para llevar a cabo el análisis multicomponente utilizando los espectros en 1ª Derivada. El intervalo óptimo se seleccionó en este caso basándonos en los valores obtenidos en cada uno de los intervalos del error relativo de predicción medio (MRPE); y del error estándar de predicción total (SEPT), los cuales están referidos al conjunto de las mezclas de validación y al conjunto de los componentes. Para ello se utilizaron las veinte mezclas cuaternarias de la tabla IX. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XI. El intervalo óptimo seleccionado es aquel que presente un valor mínimo en ambos parámetros, es decir, el intervalo comprendido entre 250 y 380 nm.

TABLA XI. MRPE(%) y SEPT para diferentes intervalos de longitudes de onda.

Intervalo de longitudes de onda (nm)	MRPE	SEPT
200 - 400	20.9	4.0
200 - 380	20.9	4.0
210 - 380	21.1	4.0
220 - 380	21.9	4.2
230 - 380	21.5	4.1
230 - 400	21.5	4.1
240 - 380	21.4	4.1
240 - 400	21.4	4.1
250 - 380	12.3	2.4
270 - 400	13.0	2.5
270 - 380	13.0	2.5

D.1.2.d. Determinación de clorofenoles en diferentes mezclas

Se estudio la determinación de los clorofenoles en distintas mezclas cuaternarias, ternarias y binarias en el rango de concentración entre 0 y 15 mg/L (Tabla XII) aplicando el método directo CLS y considerando las condiciones seleccionadas en los apartados anteriores, es decir, utilización de la primera derivada e intervalo de longitudes de onda comprendido entre 250 y 380 nm.

Los resultados obtenidos para cada clorofenol se muestran en la figura 15 en donde se representa la concentración estimada frente a la concentración real de cada uno de ellos. Esta comparación tiene como principal interés la identificación de errores sistemáticos. En ausencia de estos, es decir, en el caso ideal de que exista una total correlación entre la concentración real y la estimada, la recta de regresión lineal debería tener ordenada en el origen igual a cero y pendiente y coeficiente de regresión igual a uno. En la práctica, esto nunca ocurre debido a la presencia de errores aleatorios, por lo que es necesario determinar el intervalo de confianza, normalmente al 95% de nivel de confianza, tanto de la ordenada en el origen, como de la pendiente para encontrar posibles diferencias significativas. En el caso que nos ocupa, se observa que el 2-clorofenol muestra, en general, resultados inferiores al valor teórico a todos los niveles de concentración, dando una pendiente significativamente diferente del caso ideal. Con respecto al pentaclorofenol, este muestra concentraciones superiores al valor teórico o real a niveles de concentración grandes, y tanto la ordenada en el origen como la pendiente muestran diferencias significativas del comportamiento ideal. Por otra parte, el 4-cloro-3-metilfenol y el 2,4-diclorofenol presentan una buena correlación entre la concentración real y la estimada.

TABLA XII. Composición de las mezclas utilizadas en la etapa de validación del método directo CLS (mg/L).

Mezcla	2CF	4C3MF	DCF	PCF
1	15.0	11.0	7.0	3.0
2	15.0	7.0	3.0	7.0
3	11.0	13.0	15.0	13.0
4	7.0	5.0	3.0	5.0
5	3.0	11.0	13.0	5.0
6	13.0	9.0	7.0	15.0
7	15.0	15.0	9.0	7.0
8	5.0	3.0	13.0	15.0
9	15.0	7.0	7.0	15.0
10	11.0	5.0	11.0	13.0
11	7.0	5.0	15.0	15.0
12	5.0	11.0	3.0	9.0
13	3.0	11.0	9.0	13.0
14	7.0	7.0	9.0	9.0
15	11.0	3.0	3.0	5.0
16	9.0	11.0	9.0	5.0
17	3.0	5.0	9.0	15.0
18	13.0	9.0	9.0	5.0
19	9.0	11.0	13.0	7.0
20	15.0	7.0	9.0	9.0
21	9.0	0.0	7.0	5.0
22	0.0	5.0	3.0	7.0
23	5.0	9.0	7.0	0.0
24	0.0	7.0	5.0	5.0
25	5.0	3.0	0.0	7.0
26	5.0	0.0	9.0	7.0
27	7.0	5.0	0.0	3.0
28	5.0	7.0	5.0	0.0
29	0.0	3.0	0.0	7.0
30	0.0	0.0	7.0	5.0
31	5.0	0.0	3.0	0.0
32	5.0	3.0	0.0	0.0
33	0.0	5.0	7.0	0.0
34	0.0	7.0	0.0	5.0
35	7.0	5.0	0.0	0.0
36	9.0	0.0	0.0	5.0

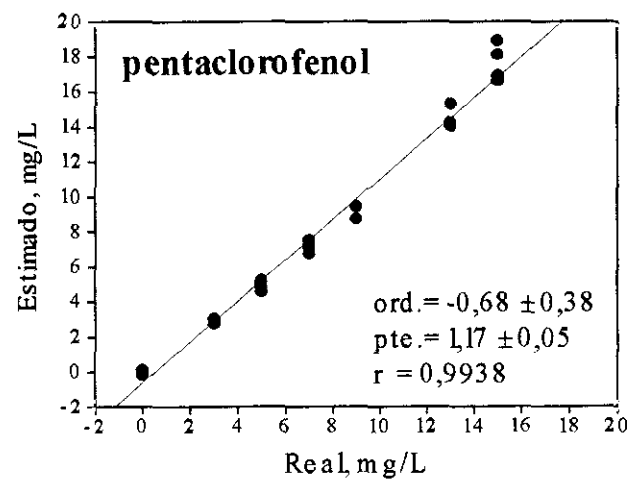
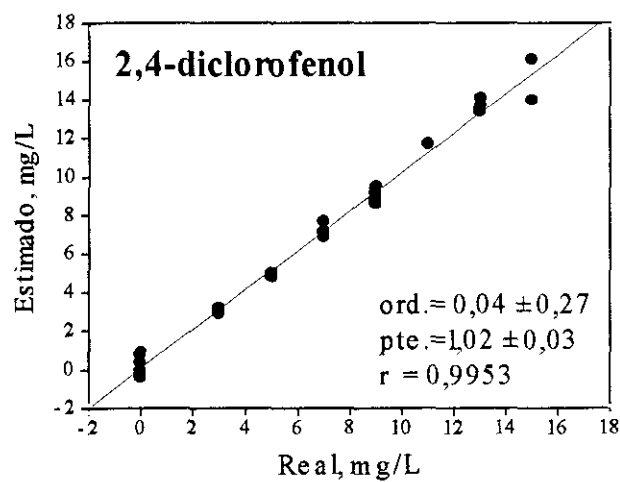
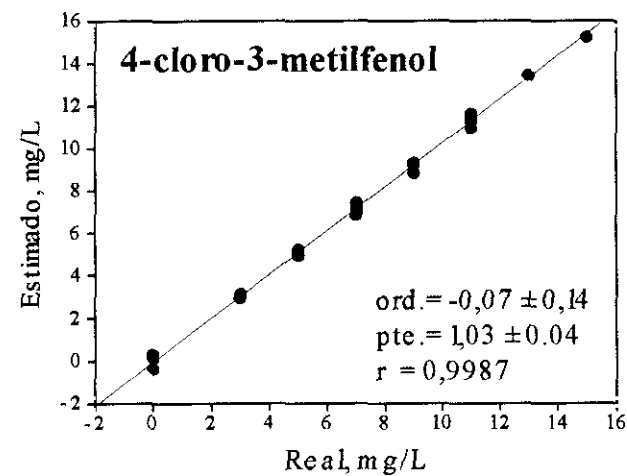
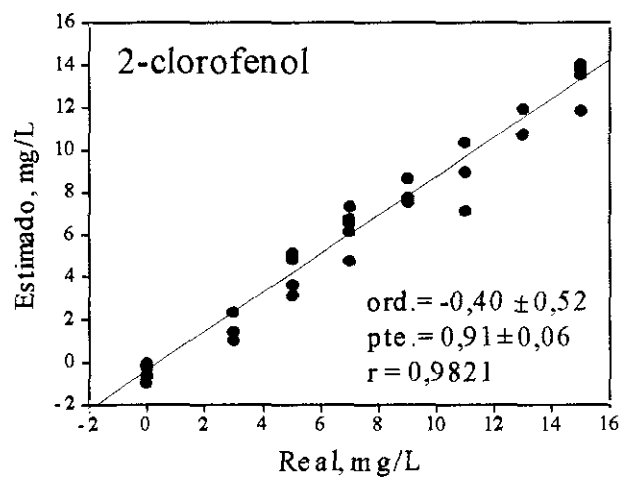


Fig. 15.- Concentración real frente a concentración estimada. Método directo CLS. ($\alpha = 0.05$).

Otra forma de determinar la bondad del método de calibración en la determinación de cada clorofenol, es calcular el correspondiente RPE, SEP y R^2 para cada uno de ellos, considerando todas las mezclas de forma conjunta. Los resultados se muestran en la tabla XIII.

TABLA XIII. RPE(%), SEP(mg/L) y R^2 para cada clorofenol obtenidos aplicando el método directo CLS.

Clorofenol	RPE	SEP	R^2
2-clorofenol	17.7	1.5	0.915
4-cloro-3-metilfenol	8.2	0.6	0.875
2,4-diclorofenol	6.8	0.5	0.959
Pentaclorofenol	13.3	1.1	0.719

A partir de esta tabla se puede concluir que tanto el 4-cloro-3-metilfenol como el 2,4-diclorofenol son los dos clorofenoles que se determinan con una mayor precisión y exactitud, con valores de RPE de 8.2% y 6.8% respectivamente, mientras que, ahora, el 2-clorofenol a pesar de tener una menor precisión y exactitud con respecto a los demás clorofenoles, presenta una gran correlación global entre la concentración estimada y la real ($R > 0.957$). En el caso del pentaclorofenol, éste presenta un RPE intermedio con respecto a los otros tres clorofenoles, sin embargo, el modelo de calibración utilizado no presenta una correlación razonable entre la concentración estimada y la real por lo que dicho modelo no se puede considerar totalmente correcto para el caso particular de este clorofenol.

D.1.3. Determinación simultánea de clorofenoles mediante calibración multivariante CLS y espectrofotometría derivada

Siguiendo el procedimiento descrito en C.4.1.c. se llevo a cabo la determinación de clorofenoles mediante un método de calibración multivariante de mínimos cuadrados clásico (CLS). Como cualquier otro método de calibración multivariante, este tiene dos etapas bien diferenciadas, la etapa de calibración y la de predicción o validación.

D.1.3.a. Etapa de calibración

Durante esta etapa tiene lugar la obtención de los espectros de referencia de cada clorofenol. Para ello se utilizó una serie de mezclas que contenían cada uno de los clorofenoles. El hecho de utilizar una serie de mezclas para obtener los espectros de referencia de cada componente es lo que diferencia la calibración multivariante del método directo en el cual se utilizan los componentes puros (univariantes) para obtener dichos espectros. Concretamente, en este caso, se utilizaron 20 mezclas cuaternarias con concentraciones comprendidas entre 3 y 15 mg/L (Tabla XIV) y sus espectros en primera derivada. Los espectros en primera derivada, obtenidos mediante calibración multivariante CLS, para cada uno de los clorofenoles se muestran en la figura 16.

TABLA XIV. Composición de las mezclas utilizadas en la etapa de calibración del método multivariante CLS (mg/L). Método manual.

Mezcla	2CF	4C3MF	DCF	PCF
1	15.0	11.0	7.0	3.0
2	15.0	7.0	3.0	7.0
3	11.0	13.0	15.0	13.0
4	7.0	5.0	3.0	5.0
5	3.0	11.0	13.0	5.0
6	13.0	9.0	7.0	15.0
7	15.0	15.0	9.0	7.0
8	5.0	3.0	13.0	15.0
9	15.0	7.0	7.0	15.0
10	11.0	5.0	11.0	13.0
11	7.0	5.0	15.0	15.0
12	5.0	11.0	3.0	9.0
13	3.0	11.0	9.0	13.0
14	7.0	7.0	9.0	9.0
15	15.0	7.0	9.0	9.0
16	9.0	11.0	9.0	5.0
17	9.0	11.0	13.0	7.0
18	11.0	3.0	3.0	5.0
19	13.0	9.0	9.0	5.0
20	3.0	5.0	9.0	15.0

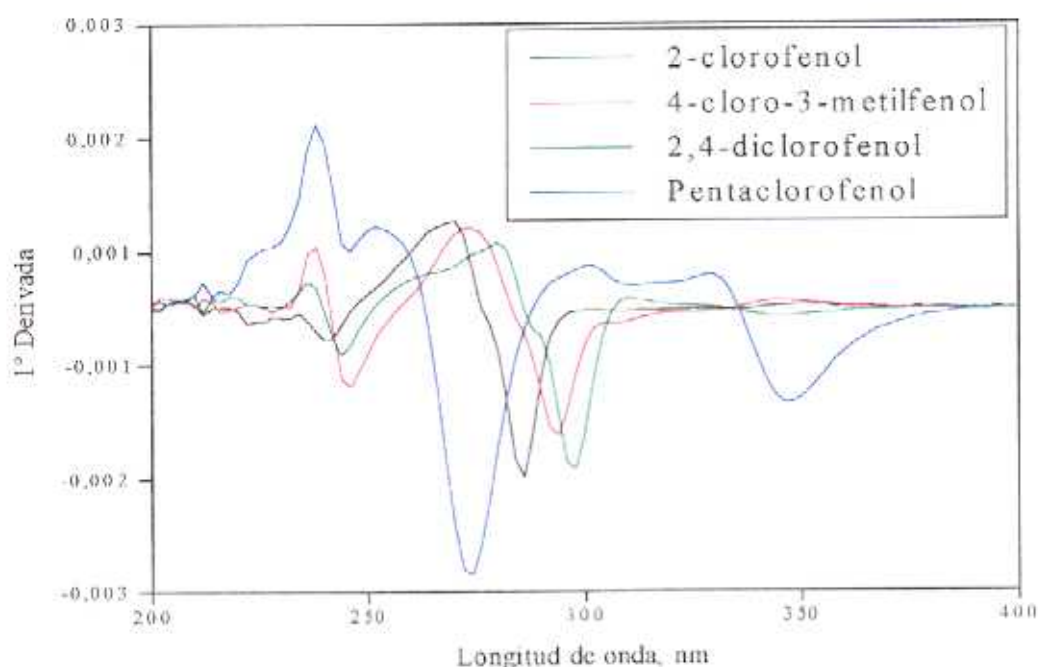


Fig. 16.- Espectros de referencia en 1ª Derivada de cada clorofenol obtenidos mediante calibración multivariante CLS a partir de las mezclas de la tabla XIV.

D.1.3.b. Etapa de validación

Para llevar a cabo la validación del método de calibración multivariante aplicado, se utilizaron una serie de mezclas cuaternarias, ternarias y binarias de los correspondientes clorofenoles, y cuyo diseño se muestra en la tabla XV.

Puesto que la precisión y exactitud de los resultados dependen del intervalo de longitudes de onda empleado, se procedió a realizar una selección previa de dicho intervalo en función los resultados de MRPE y SEPT, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla XVI. En base a dichos resultados se observa que existen dos intervalos, 270-380 nm y 270-400 nm, los cuales presentan el mismo valor de MRPE y SEPT, seleccionándose el comprendido entre 270-380 nm puesto que al ser el intervalo más pequeño, el cálculo matemático

TABLA XV. Composición de las mezclas utilizadas en la etapa de validación del método multivariante CLS (mg/L). Método manual.

Mezcla	2CF	4C3MF	DCF	PCF
1	3.0	11.0	13.0	7.0
2	11.0	5.0	5.0	11.0
3	5.0	5.0	9.0	7.0
4	15.0	9.0	3.0	3.0
5	3.0	15.0	15.0	9.0
6	3.0	3.0	5.0	11.0
7	5.0	7.0	5.0	0.0
8	0.0	7.0	5.0	5.0
9	9.0	0.0	7.0	5.0
10	7.0	5.0	9.0	0.0
11	0.0	7.0	7.0	7.0
12	7.0	5.0	0.0	3.0
13	0.0	5.0	3.0	3.0
14	9.0	7.0	0.0	5.0
15	5.0	0.0	3.0	0.0
16	5.0	3.0	0.0	0.0
17	0.0	3.0	0.0	7.0
18	7.0	5.0	0.0	0.0
19	0.0	0.0	7.0	5.0
20	0.0	5.0	7.0	0.0
21	9.0	0.0	0.0	5.0

TABLA XVI. MRPE(%) y SEPT para diferentes intervalos de longitudes de onda. Calibración multivariante CLS.

Intervalo de longitud de onda (nm)	MRPE	SEPT
200 - 380	8.7	1.7
200 - 400	8.7	1.7
210 - 380	8.9	1.7
220 - 380	8.8	1.7
230 - 380	8.8	1.7
230 - 400	8.8	1.7
240 - 380	8.8	1.7
240 - 400	8.8	1.7
250 - 380	6.8	1.3
270 - 380	5.3	1.0
270 - 400	5.3	1.0
280 - 380	5.4	1.0
290 - 380	5.8	1.1

se realiza de forma más rápida, mientras que las longitudes de onda por encima de 380 nm seguramente no aportan ninguna información relevante o significativa sobre el sistema, al ser la absorbancia prácticamente cero (figura 16). Por otra parte, se observa que este intervalo es inferior al considerado en el método directo (250-380 nm), sin embargo, y atendiendo a los valores del SEPT, no presenta diferencias significativas con este en ninguno de los dos métodos a un nivel de confianza del 95%, seleccionándose uno u otro teniendo en cuenta el valor más pequeño de MRPE y SEPT en cada uno de los casos.

Los resultados de la determinación de los clorofenoles en las diferentes mezclas de validación, que se obtienen para el intervalo de longitudes de onda seleccionado, se muestran en la figura 17. A partir de dicha figura se observa una gran mejoría en los resultados obtenidos con respecto al método directo; no encontrándose, ahora, desviaciones significativas tanto en la ordenada en el origen como en la pendiente, para ninguno de los clorofenoles estudiados. No obstante, para comparar los dos métodos (directo y multivariante) de una forma global, es adecuado partir de los valores de RPE, SEP y R^2 obtenidos para cada clorofenol, y cuyos resultados se muestran en la tabla XVII.

TABLA XVII. RPE(%), SEP(mg/L) y R^2 para cada clorofenol obtenidos aplicando el método de calibración multivariante CLS.

Clorofenol	RPE	SEP	R^2
2-clorofenol	4.0	0.3	0.986
4-cloro-3-metilfenol	4.1	0.3	0.967
2,4-diclorofenol	4.8	0.3	0.994
Pentaclorofenol	6.5	0.4	0.913

A la vista de estos resultados, se deduce que el método multivariante es muy superior con respecto al método directo (tabla XIII), obteniéndose ahora un valor de RPE del orden de cuatro veces inferior para el 2-clorofenol y de dos veces inferior para el caso del 4-cloro-3-metilfenol y pentaclorofenol, siendo el 2,4-diclorofenol el que presenta una menor disminución de este valor. Por otra parte, aplicando una distribución F de Snedecor sobre los valores del SEP obtenidos para cada método y clorofenol, se observan diferencias

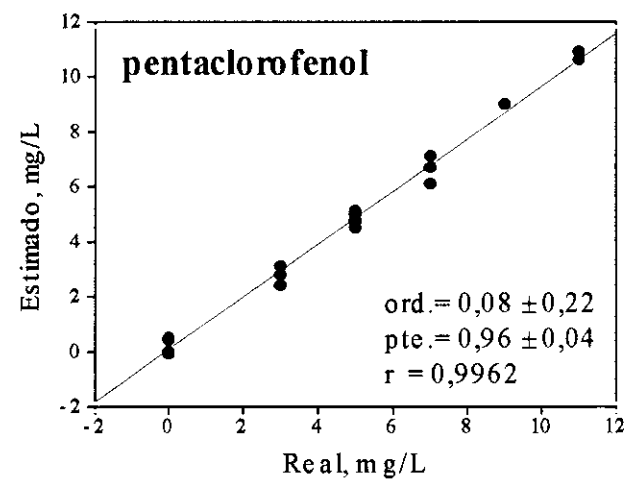
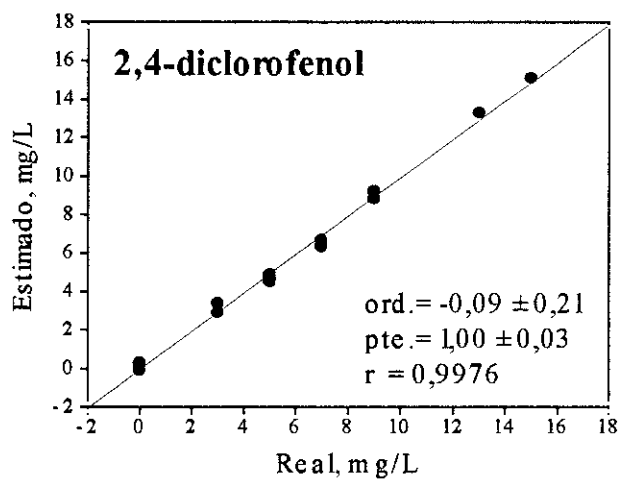
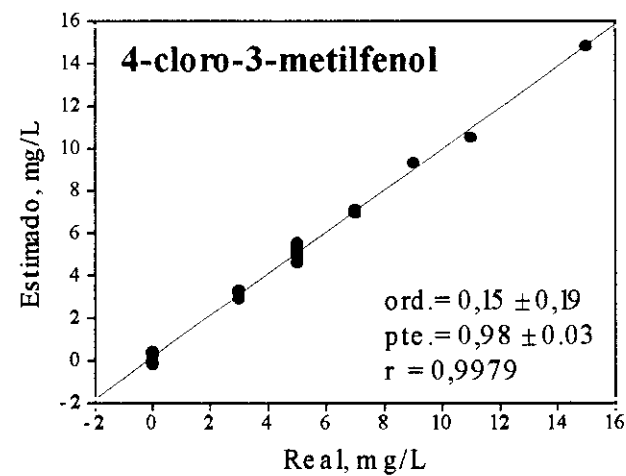
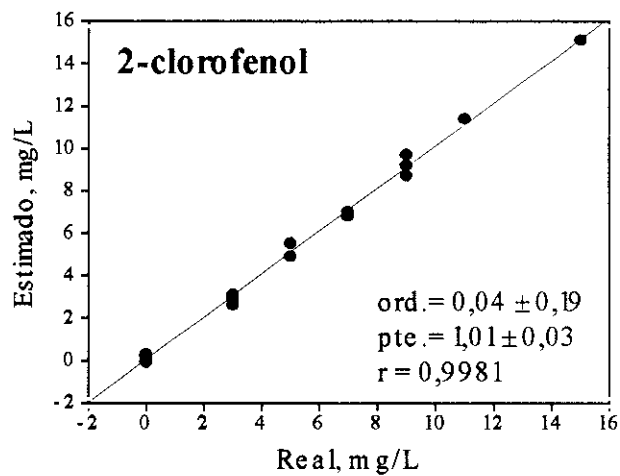


Fig. 17.- Concentración real frente a concentración estimada. Método de calibración multivariante CLS. ($\alpha = 0,05$)

significativas al nivel de confianza del 95% entre ambos métodos para todos los clorofenoles (tabla XVIII). Igualmente la correlación entre la concentración estimada y la concentración real es bastante buena siendo el coeficiente de correlación múltiple (R) superior en todos los casos al obtenido mediante el método directo. Este hecho es más acusado para el caso del pentaclorofenol, haciendo que el método CLS pase de ser un mal método para su determinación cuando se utiliza el método directo de calibración, a poder ser considerado como un método correcto cuando se emplea un método multivariante de calibración.

TABLA XVIII. F calculado para cada clorofenol.
Comparación entre el método
directo y multivariante CLS.

Clorofenol	F _{cal}
2-clorofenol	25
4-cloro-3-metilfenol	4.0
2,4-diclorofenol	2.8
Pentaclorofenol	7.6

$$F_{\text{crit.}}(95\%) = 1.98$$

D.1.4. Determinación simultánea de clorofenoles mediante diferentes métodos de calibración multivariante. Estudio comparativo de los métodos CLS, ILS, KF, PCR, PLS

Los estudios realizados en los apartados D.1.2. y D.1.3. ponen de manifiesto las importantes diferencias que en la determinación simultánea de los clorofenoles 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol da lugar el procedimiento de calibración seguido para la obtención de la matriz de coeficientes (**K**); aun cuando en la resolución multicomponente de las mezclas se utilizó en ambos el método de regresión clásica de mínimos cuadrados (CLS).

Dada la importancia que el método de calibración puede tener sobre los resultados del análisis, en este apartado se procedió a realizar un estudio comparativo de diferentes métodos de calibración multivariante, que incluyen métodos de regresión lineal, tanto clásica como inversa (CLS e ILS), un método lineal iterativo (KF) y dos métodos bilineales (PCR y PLS).

Para la realización de este estudio se partió de un diseño aleatorio de 37 mezclas de calibración (tabla XIX) y de 14 mezclas de validación (tabla XX) en las que se incluyen mezclas de cuatro, tres y dos clorofenoles.

A partir del conjunto de 37 mezclas de calibración se hizo un estudio previo para estimar cual era el número mínimo de mezclas necesario para obtener los mejores resultados de validación para cada uno de los métodos de calibración multivariante propuesto. Esta estimación se hizo en base al error estándar de predicción (SEP) obtenido para cada uno de los clorofenoles, a partir de las mezclas de validación.

TABLA XIX. Composición de las mezclas de calibración (mg/L).

Mezcla	2CF	4C3MF	DCF	PCF
1	11.0	13.0	15.0	13.0
2	15.0	9.0	3.0	3.0
3	3.0	5.0	9.0	15.0
4	3.0	11.0	13.0	5.0
5	15.0	7.0	3.0	7.0
6	15.0	7.0	7.0	15.0
7	5.0	3.0	13.0	15.0
8	15.0	7.0	9.0	9.0
9	11.0	5.0	11.0	13.0
10	9.0	11.0	13.0	7.0
11	9.0	11.0	9.0	5.0
12	11.0	5.0	5.0	11.0
13	5.0	5.0	9.0	7.0
14	5.0	11.0	3.0	9.0
15	15.0	11.0	7.0	3.0
16	7.0	5.0	15.0	15.0
17	15.0	15.0	9.0	7.0
18	7.0	5.0	3.0	5.0
19	3.0	3.0	5.0	11.0
20	11.0	3.0	3.0	5.0
21	7.0	7.0	9.0	9.0
22	13.0	9.0	9.0	5.0
23	5.0	9.0	7.0	0.0
24	0.0	7.0	5.0	5.0
25	5.0	3.0	0.0	7.0
26	5.0	0.0	9.0	7.0
27	7.0	5.0	0.0	3.0
28	5.0	7.0	5.0	0.0
29	0.0	5.0	3.0	3.0
30	0.0	5.0	3.0	7.0
31	7.0	0.0	5.0	3.0
32	0.0	3.0	0.0	7.0
33	0.0	0.0	3.0	7.0
34	5.0	0.0	3.0	0.0
35	0.0	0.0	5.0	7.0
36	5.0	3.0	0.0	0.0
37	0.0	5.0	0.0	3.0

TABLA XX. Composición de las mezclas de validación (mg/L).

Mezcla	2CF	4C3MF	DCF	PCF
1	13.0	9.0	7.0	15.0
2	3.0	11.0	9.0	13.0
3	3.0	11.0	13.0	7.0
4	3.0	15.0	15.0	9.0
5	7.0	5.0	9.0	0.0
6	9.0	7.0	0.0	5.0
7	0.0	7.0	7.0	7.0
8	9.0	0.0	7.0	5.0
9	7.0	5.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	7.0	5.0
11	7.0	0.0	5.0	0.0
12	0.0	7.0	0.0	5.0
13	0.0	5.0	7.0	0.0
14	9.0	0.0	0.0	5.0

Con el grupo óptimo de mezclas obtenido para cada método de calibración multivariante se hizo posteriormente una selección de las longitudes de onda más idóneas para cada uno de los métodos, considerando, en este caso, dos criterios de selección, número de condición de la matriz **K** de calibración y relación señal-ruido, los cuales son independientes de la precisión y exactitud del método de calibración multivariante empleado. De estos criterios, uno de ellos está relacionado con la amplificación del error relativo en la estimación de la concentración (número de condición), y el otro se basa en la sensibilidad que presentan cada una de las longitudes de onda a cada uno de los componentes (relación señal-ruido).

Los resultados de estos estudios se muestran a continuación.

D.1.4.a. Estimación del número mínimo de mezclas de calibración

Este estudio se realizó siguiendo el procedimiento descrito en C.4.1.d. En la tabla XXI se muestran los grupos de mezclas seleccionados a partir del método propuesto por Honigs y col. (525), consistente en seleccionar, mediante técnicas de álgebra lineal, aquellas mezclas que presentan características espectrales únicas, las cuales presentan, igualmente, una gran variación en su composición química.

TABLA XXI. Mezclas seleccionadas utilizando el procedimiento de Honigs y col.

Grupo	Mezclas Seleccionadas ^a							
1	1	2	3	4	5			
2	9	6	12	24	23			
3	28	26	11	14	8			
4	15	32	16	25	27			
5	33	10	35	17	34			
6	31	19	22	29	30			
7	7	18	13	36	37	21	20	

a. El número corresponde a la mezcla de la tabla XVIII.

Para seleccionar el número óptimo de mezclas, se consideró el valor de SEP obtenido a partir de las mezclas de validación en el intervalo comprendido entre 220 y 380 nm para todos los métodos de calibración multivariante, excepto el ILS, el cual se encuentra limitado por el número de mezclas seleccionado cada vez. Los resultados obtenidos para el caso del CLS, KF, PLS y PCR se muestran en las figuras 18 a la 21. A partir de estas figuras se observa que para

el caso del CLS y KF (figuras 18 y 19) el valor de SEP alcanza un valor prácticamente constante, para todos los clorofenoles a partir de 20 mezclas; lo que indica que la precisión no mejora al incrementar el número de mezclas empleadas en la calibración.

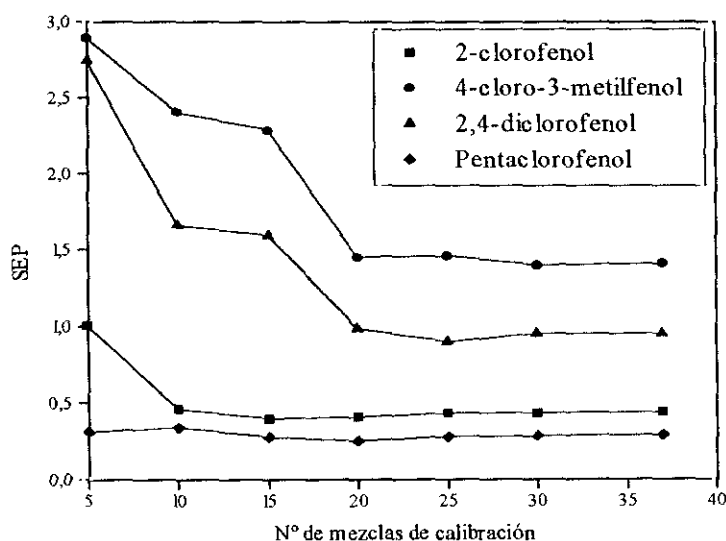


Fig. 18.- Influencia del número de mezclas de calibración en la precisión del CLS.

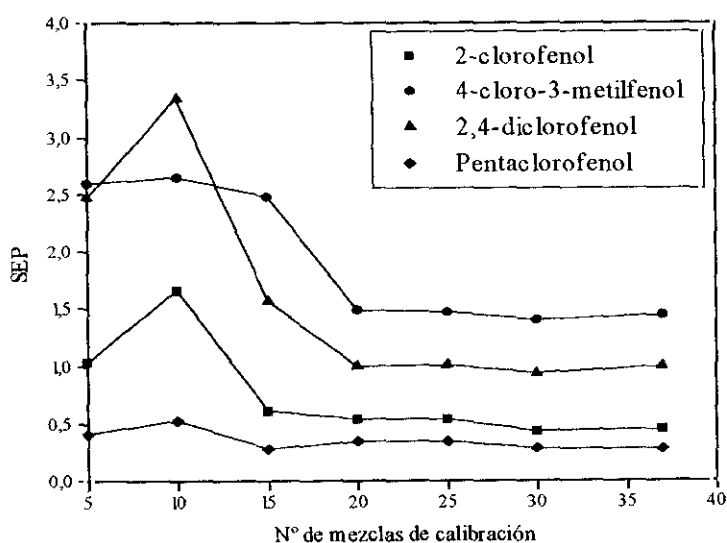


Fig. 19.- Influencia del número de mezclas de calibración en la precisión del KF.

En el caso particular del PCR y PLS, un paso previo, es el cálculo del número de factores o variables latentes óptimo, el cual fue obtenido mediante validación de cruce para cada conjunto de mezclas considerado. Dichos factores varían entre 3 y 7 para el caso del PCR y entre 3 y 6 para el caso del PLS. Como se puede observar en las figuras 20 y 21, a partir de 15 mezclas el valor de SEP alcanza un valor prácticamente constante.

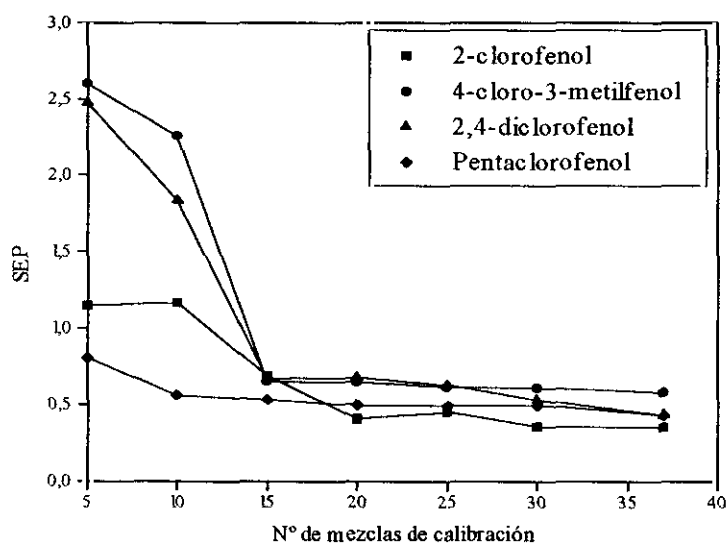


Fig. 20.- Influencia del número de mezclas de calibración en la precisión del PCR

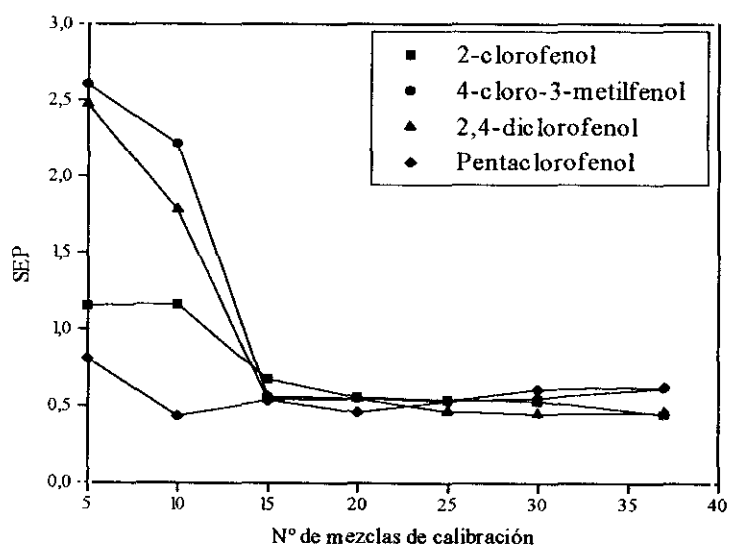


Fig. 21.- Influencia del número de mezclas de calibración en la precisión del PLS

Para el caso del ILS no es posible utilizar el mismo intervalo de longitudes de onda que en los anteriores métodos puesto que, como es sabido, el número de longitudes de onda no puede ser superior al de mezclas de calibración. En este caso se seleccionaron previamente 15 longitudes de onda en función de su relación S/N, comenzando el proceso de estimación, por tanto, con 15 mezclas de calibración como mínimo (grupos 1, 2 y 3 de la tabla XXI). Los resultados se muestran en la figura 22, observándose como a partir de 20 mezclas el valor de SEP alcanza un valor prácticamente constante no existiendo diferencias significativas.

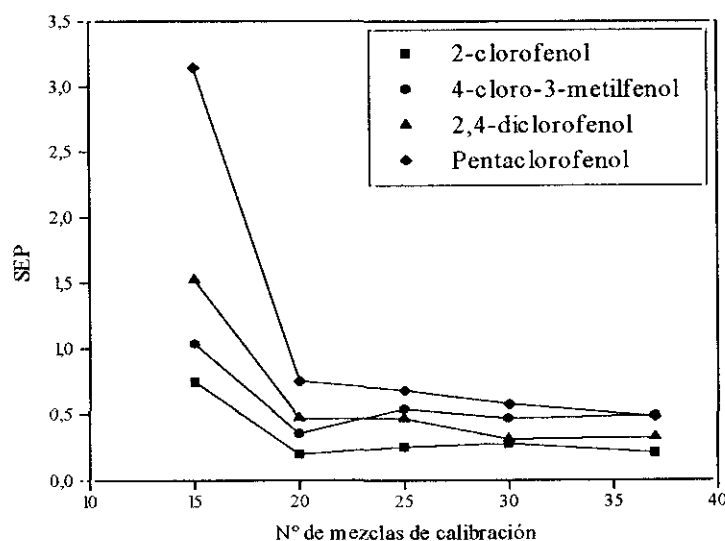


Fig. 22.- Influencia del número de mezclas de calibración en la precisión del ILS

Por consiguiente el número de mezclas seleccionadas para cada uno de los métodos de calibración multivariante fue para el caso del CLS, KF e ILS de 20 mezclas (grupos 1, 2, 3 y 4 de la tabla XXI) mientras que para el PCR y PLS de 15 mezclas (grupos 1, 2 y 3 de la tabla XXI).

D.1.4.b. Selección de las longitudes de onda

Para la selección de las longitudes de onda a utilizar en la determinación multicomponente se consideraron dos criterios, el número de condición ($\text{cond}(\mathbf{K})$) y la relación señal-ruido (S/N). El número de condición, como ya se ha comentado en la revisión bibliográfica, es una medida de la amplificación del error y de la precisión y exactitud del sistema. La selección del rango de longitudes de onda a partir de este parámetro se basa en la minimización del mismo. Por otra parte, la selección a partir de la relación S/N se basa en elegir aquellas longitudes de onda que presentan una mayor relación S/N para cada uno de los componentes.

La tabla XXII se muestra el $\text{cond}(\mathbf{K})$ para diferentes intervalos de longitud de onda, calculado considerando la matriz \mathbf{K} de calibración obtenida mediante CLS y KF a partir de las 20 mezclas seleccionadas para estos métodos. A la vista de los resultados de dicha tabla, se observa que el valor mínimo para el $\text{cond}(\mathbf{K})$ corresponde a los intervalos 280-340, 280-330, 280-320, 280-310 y 280-300 nm en ambos casos. Para seleccionar el intervalo óptimo se consideró el valor del MRPE y del SEPT, de cada uno de ellos, los cuales se muestran en la tabla XXIII. A partir de dichos resultados se comprueba que el intervalo que contiene un menor número de longitudes de onda (280-300 nm) presenta los mejores resultados. Este resultado puede ser debido a que en dicho intervalo se encuentran las longitudes de onda que presentan una mayor información del sistema, al estar incluidas, en general, las bandas espectrales más características de cada clorofenol.

En cuanto a la relación S/N , se seleccionaron un máximo de 37 longitudes de onda en función del valor de dicha relación. Estas 37 longitudes de onda se dividieron en 7 grupos, ordenadas de mayor a menor relación S/N (tabla XXIV). Para determinar el número óptimo de longitudes de onda se calculó el valor de SEP en función del número de longitudes de onda utilizadas.

TABLA XXII. Número de condición (cond(K)) para diferentes intervalos.

Intervalo de longitud de onda (nm)	cond(K)	
	CLS	KF
220 - 380	4.9	4.8
230 - 380	4.8	4.7
240 - 380	5.1	5.0
250 - 380	6.1	6.0
260 - 380	6.5	6.3
270 - 380	6.3	6.1
280 - 380	3.9	3.7
290 - 380	8.5	8.2
280 - 370	3.9	3.7
280 - 360	3.9	3.7
280 - 350	3.9	3.7
280 - 340	3.8	3.6
280 - 330	3.8	3.6
280 - 320	3.8	3.6
280 - 310	3.8	3.6
280 - 300	3.8	3.6
270 - 300	6.3	6.1
260 - 300	6.5	6.3
250 - 300	6.1	5.9
240 - 300	5.1	4.9
230 - 300	4.8	4.7
270 - 310	6.0	5.8
260 - 320	6.2	6.0

TABLA XXIII. MRPE(%) y SEPT de los intervalos con menor cond(K).

Intervalo de longitud de onda (nm)	CLS		KF	
	MRPE	SEPT	MRPE	SEPT
280 - 340	6.3	0.38	8.3	0.54
280 - 330	6.6	0.40	8.6	0.56
280 - 320	6.9	0.42	8.8	0.58
280 - 310	5.7	0.35	7.4	0.50
280 - 300	4.0	0.27	5.7	0.43

TABLA XXIV. Longitudes de onda seleccionadas a partir de su relación S/N.

Grupo	Longitudes de onda (nm)							
1	268	272	288	296	344			
2	264	276	280	284	300			
3	248	256	260	348	352			
4	236	252	292	356	360			
5	244	304	324	328	340			
6	224	320	332	364	372			
7	232	240	308	312	316	368	376	

Este estudio se realizó para todos los métodos considerando el número de mezclas óptimo para cada uno de ellos. Puesto que para el caso del ILS, el número máximo posible de longitudes de onda depende del número de mezclas de calibración, se hizo un estudio conjunto del número de longitudes de onda en función del número de mezclas de calibración. Para el PCR y PLS el número

de factores se calculó a partir de la validación de cruce para cada uno de los casos. Este número de factores varía entre 3 y 8 en el PCR y entre 3 y 7 en el PLS. Los resultados se muestran en las figuras 23 a 27.

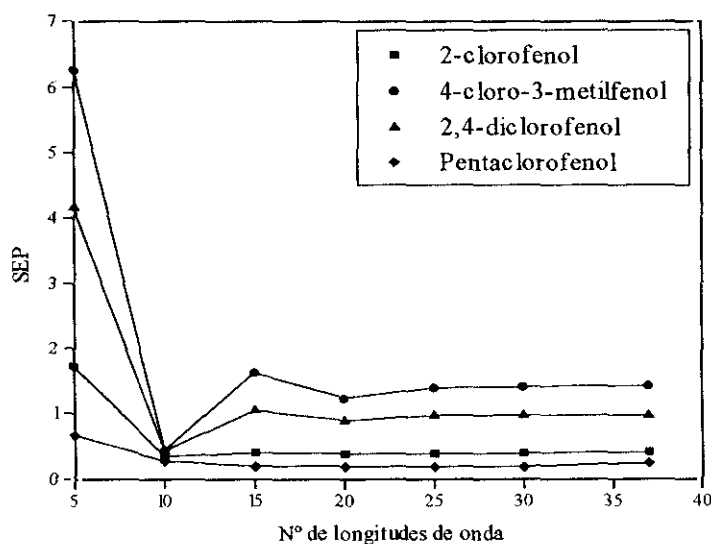


Fig. 23.- Influencia del número de longitudes de onda en la precisión del CLS

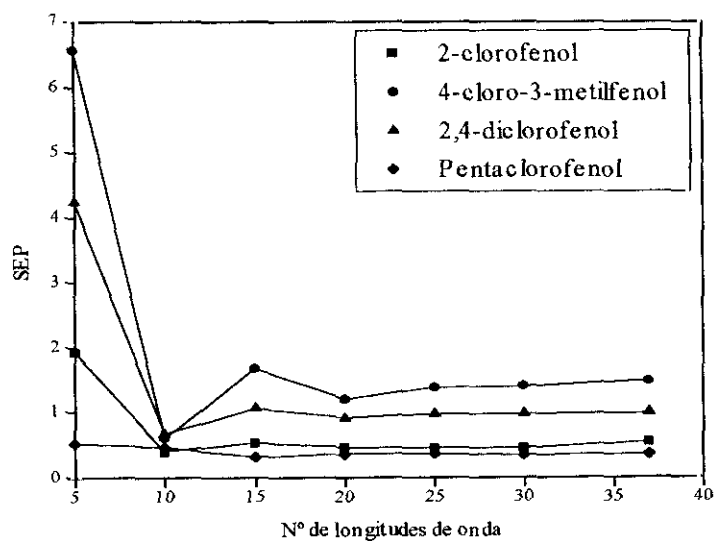


Fig. 24.- Influencia del número de longitudes de onda en la precisión del KF

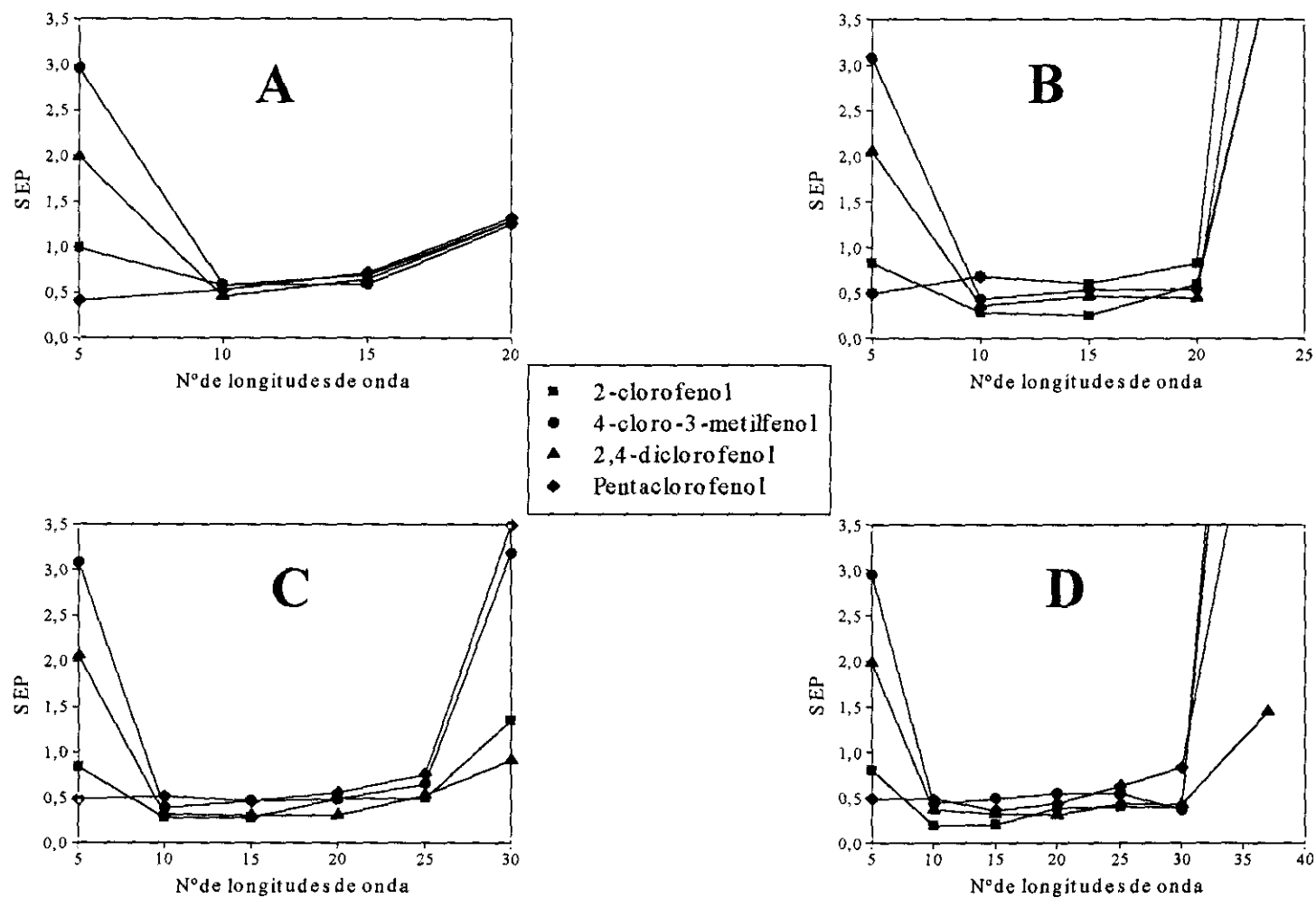


Fig. 25.- Influencia del número de longitudes de onda en la precisión del método ILS utilizando: (A) 20 mezclas, (B) 25 mezclas, (C) 30 mezclas y (D) 37 mezclas de calibración.

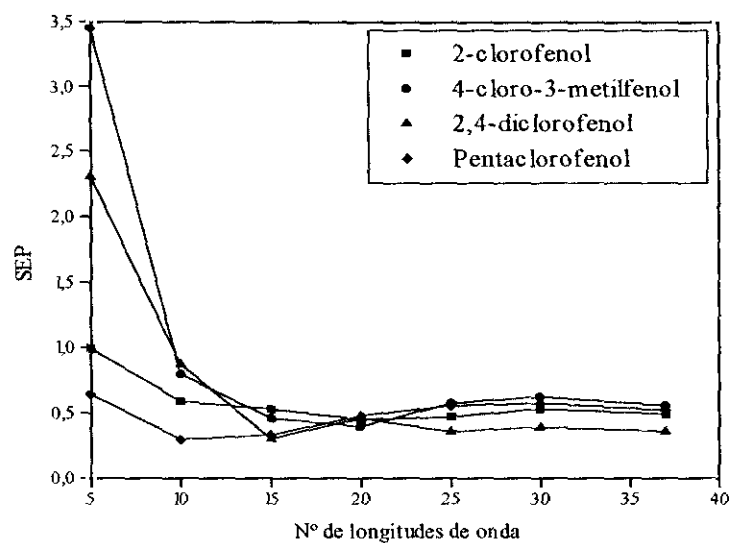


Fig. 26.- Influencia del número de longitudes de onda en la precisión del PCR

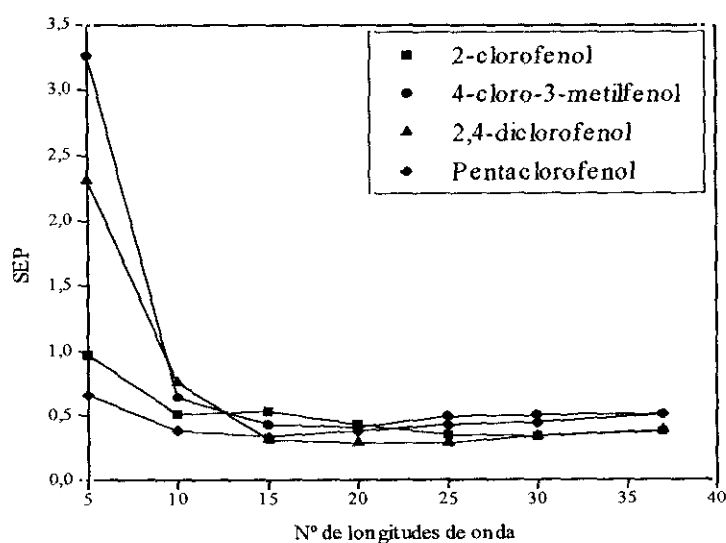


Fig. 27.- Influencia del número de longitudes de onda en la precisión del PLS

A partir de estas figuras se comprueba que para el CLS y KF (figuras 23 y 24) el número óptimo de longitudes de onda es 10 (grupos 1 y 2 de la tabla XXIV). El hecho de aumentar el número de longitudes de onda no mejora la precisión de los métodos, obteniéndose incluso peores resultados para el caso del 4-cloro-3-metilfenol y 2,4-diclorofenol. Para el ILS (figura 25) se observa que cuando el número de longitudes de onda es igual al número de mezclas de calibración se obtienen los peores resultados, siendo necesario seleccionar un número de longitudes de onda menor. Por otra parte, cuando el número de longitudes de onda es muy bajo (5 longitudes de onda) el método pierde, igualmente, capacidad de predicción; por lo tanto, es necesario seleccionar un número intermedio de longitudes de onda. En este caso se seleccionaron 15 longitudes de onda. Para el PCR y PLS (figuras 26 y 27) se observa que ambos métodos presenta resultados similares, no presentando los resultados diferencias importantes a partir de las 15 longitudes de onda, que fueron las seleccionadas (grupos 1, 2 y 3 de la tabla XXIV).

En la tabla XXV se muestran los valores de SEP para cada uno de los clorofenoles, métodos y condiciones estudiadas y seleccionadas como óptimas en cada caso particular, pudiendo concluirse que la selección previa de longitudes de onda, ya sea mediante el $\text{cond}(K)$ o la relación S/N, hace aumentar la precisión con respecto al empleo del espectro completo en el caso del CLS, KF, PCR y PLS. Para el ILS debido a la limitación que presenta con respecto al número de longitudes de onda que puede utilizarse, solo se estudió el $\text{cond}(K)$ y la relación S/N observándose en este caso que el $\text{cond}(K)$ presenta los mejores resultados. Considerando los valores obtenidos de SEPT para cada uno de los métodos y aplicando una distribución F de Snedecor, se observa que en todos los casos, excepto en el ILS, no se obtienen diferencias significativas a un nivel de confianza del 95%, entre los resultados obtenidos mediante el $\text{cond}(K)$ y la relación S/N (tabla XXVI). A partir de los valores de SEP para cada uno de los

TABLA XXV. SEP de cada clorofenol y SEPT para cada método de calibración y condiciones estudiadas.

Clorofenol	CLS			KF			ILS		PCR			PLS		
	E.C.	Cond(K)	10 λ	E.C.	Cond(K)	10 λ	Cond(K)	15 λ	E.C.	Cond(K)	15 λ	E.C.	Cond(K)	15 λ
2-clorofenol	0.41	0.23	0.34	0.54	0.27	0.39	0.33	0.69	0.69	0.62	0.53	0.67	0.62	0.68
4-cloro-3-metilfenol	1.4	0.30	0.44	1.5	0.48	0.60	0.38	0.59	0.65	0.38	0.46	0.56	0.37	0.47
2,4-diclorofenol	1.0	0.32	0.44	1.0	0.62	0.65	0.27	0.67	0.67	0.28	0.30	0.47	0.26	0.30
Pentaclorofenol	0.25	0.24	0.28	0.34	0.23	0.46	0.48	0.72	0.53	0.39	0.34	0.53	0.41	0.33
SEPT	0.94	0.27	0.39	0.99	0.43	0.57	0.38	0.70	0.65	0.45	0.43	0.58	0.45	0.49

E.C.: Espectro completo (220 - 380 nm).

Cond(K): Número de condición (280 - 300 nm).

10 λ : 10 longitudes de onda seleccionadas según su relación S/N (grupos 1 y 2 de la tabla XXIV).

15 λ : 15 longitudes de onda seleccionadas según su relación S/N (grupos 1, 2 y 3 de la tabla XXIV).

clorofenoles, únicamente se observan diferencias significativas al 95% en el caso particular del pentaclorofenol cuando se emplea el KF. Por otra parte, para el caso del PCR y PLS tampoco existen diferencias significativas al 95% entre los resultados obtenidos considerando el espectro completo y los dos métodos de selección de longitudes de onda, debido posiblemente a la propia naturaleza de dichos métodos, los cuales son capaces de discernir entre la información que es o no relevante para modelar el sistema.

TABLA XXVI. F calculado para cada método de calibración multivariante. Comparación entre los criterios de selección de longitudes de onda.

	F_{cal}		
	E.C./cond(K)	E.C./(S/N)	cond(K)/(S/N)
CLS	12	5.8	2.1
KF	5.3	3.0	1.8
ILS	—	—	3.4
PCR	2.1	2.3	1.1
PLS	1.7	1.4	1.2

E.C.: espectro completo

cond(K): número de condición

S/N: relación señal-ruido

$F_{crit.}(95\%) = 2.48$

D.2. MÉTODO AUTOMÁTICO (FIA)

Los estudios realizados en el capítulo D.1. ponen de manifiesto que es posible la determinación extractivo-espectrofotométrica simultánea de los clorofenoles contaminantes prioritarios 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol. Esta determinación puede hacerse mediante diferentes métodos multicomponente, basados tanto en calibración directa como multivariante (indirecta), siendo esta última la que ofrece los mejores resultados.

No obstante, el proceso manual seguido es largo y tedioso y está sometido a múltiples errores de carácter aleatorio, relacionados con el proceso de extracción líquido-líquido y los equilibrios involucrados en dicho proceso, que incluye, no solo el equilibrio de extracción de los fenoles sino también los de formación del par iónico y los propios del carácter ácido-base del fenol. Estos aspectos del proceso manual seguido, tienen su principal efecto sobre el 2,4,6-triclorofenol, que como se ha comentado, no ha podido ser incluido en el estudio anterior, dada la gran irreproducibilidad de los espectros obtenidos.

Una alternativa al método manual que permitiría una mayor rapidez del proceso de extracción y medida, es el empleo del análisis por inyección en flujo (FIA). Por otro lado, el empleo de un sistema FIA permite una mayor reproducibilidad en lo referente tanto a las cantidades de analito inyectado, como al tiempo que transcurre desde la extracción del analito hasta su medida espectrofotométrica; por lo que en el presente capítulo se estudiará la posibilidad de automatización del proceso extractivo-espectrofotométrico con determinación multivariante de los cuatro clorofenoles del método manual a los que se unirá el 2,4,6-triclorofenol.

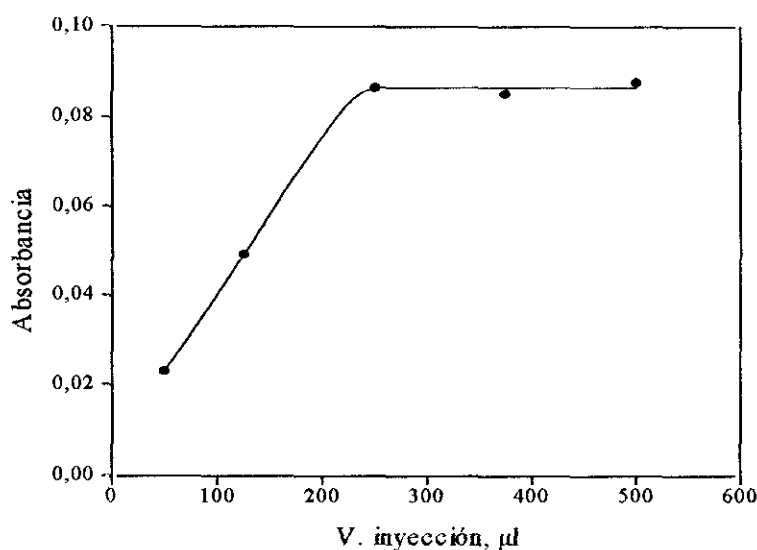
D.2.1. Optimización de las variables hidrodinámicas

Se ha procedido en primer lugar a evaluar aquellas variables hidrodinámicas del sistema FIA que pueden influir en las características analíticas del método como son: volumen de inyección, caudal de la fase acuosa y orgánica y longitud y diámetro interno del reactor y bucle de extracción. Para este estudio se utilizó como fenol de referencia el pentaclorofenol, por ser el único que, según el estudio realizado en el capítulo D.1., se extrae como par iónico y por consiguiente puede estar más influido por las variables hidrodinámicas a estudiar. Para estos estudios se registraron los fiagramas a la longitud de onda de 336 nm que corresponde a uno de los máximos del espectro del par iónico pentaclorofenol-TBA.

D.2.1.a. Volumen de inyección

La influencia del volumen de inyección se ha estudiado en el intervalo 50 a 500 μl , utilizando una concentración de pentaclorofenol de 10 mg/L. El esquema del sistema FIA empleado se muestra en la figura 1, apartado C.4.2.a.

Los resultados obtenidos, representados en la figura 28, muestran que la señal analítica aumenta con el volumen de inyección de pentaclorofenol hasta un valor de 250 μl a partir del cual la señal se mantiene prácticamente constante, por lo que se ha elegido este volumen de inyección como el óptimo.



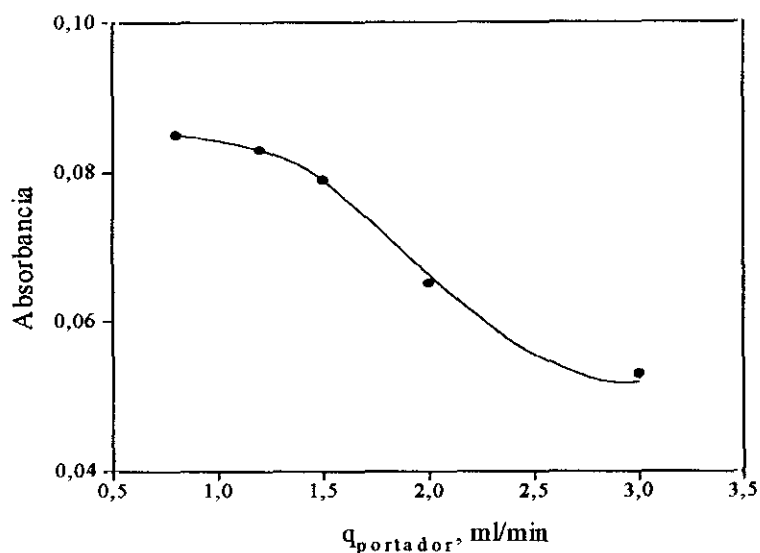
$\lambda=336 \text{ nm}$, $[\text{PCF}]=10 \text{ mg/L}$, $[\text{TBA}]=500 \text{ mg/L}$, $L_{\text{reactor}}=15 \text{ cm}$, $L_{\text{extractor}}=60 \text{ cm}$,
 $\phi=0.5 \text{ mm}$, $q_{\text{portador}}=1.2 \text{ ml/min}$, $q_{\text{TBA}}=1.2 \text{ ml/min}$, $q_{\text{disolvente}}=0.6 \text{ ml/min}$.

Fig. 28.- Influencia del volumen de inyección sobre la altura del pico FIA del sistema pentaclorofenol-TBA

D.2.1.b. Caudal de la fase acuosa

Se estudiaron la influencia del caudal del portador (disolución reguladora bórico/borato a pH 9.1) y reactivo (TBA) siguiendo el procedimiento descrito en C.4.2.a. e inyectando 250 μl de pentaclorofenol de concentración 10 mg/L.

En primer lugar se observó la influencia del caudal del portador cuando se mantenía constante el caudal de reactivo a 1.2 ml/min, y manteniendo una relación de caudales entre la fase orgánica y el portador igual a 0.5. Los resultados experimentales, representados en la figura 29, muestran que la señal analítica del sistema pentaclorofenol-TBA disminuye al aumentar el caudal de portador, debido a la dilución del TBA, cuya concentración afecta a la intensidad



$\lambda=336$ nm, $[\text{PCF}]=10$ mg/L, $[\text{TBA}]=500$ mg/L, $L_{\text{reactor}}=15$ cm, $L_{\text{extractor}}=60$ cm, $\phi=0.5$ mm, $V_{\text{iny}}=250$ μl , $q_{\text{TBA}}=1.2$ ml/min, $q_{\text{disolvente}}/q_{\text{portador}}=0.5$.

Fig. 29.- Influencia del caudal de portador sobre la altura del pico FIA del sistema pentaclorofenol-TBA

de la señal analítica, como ya se vio en el estudio del método manual (subapartado D.1.1.c., figura 12).

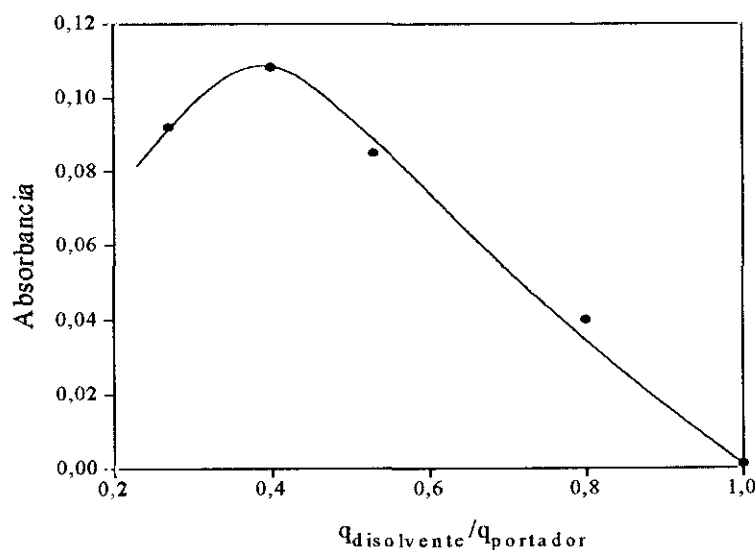
Puesto que la velocidad de muestreo aumenta con el caudal, pero, por contra, al aumentar éste disminuye la sensibilidad, se tomó como caudal de compromiso para posteriores estudios 1.5 ml/min de disolución portadora.

A continuación se estudio la influencia del caudal del reactivo variando entre 0.8 y 1.5 ml/min y fijando la velocidad de la disolución portadora a 1.5 ml/min y la relación de caudales fase orgánica/portador a 0.5. este estudio no mostró diferencias importantes para los caudales ensayados, por lo que se eligió un caudal de 1.2 ml/min para el TBA.

D.2.1.c. Caudal de la fase orgánica

Con el fin de conseguir mayor sensibilidad en el método, se probaron diferentes relaciones de volumen de fase orgánica/portador en el intervalo 1-0.27, manteniendo constante el caudal de portador a 1.5 ml/min y el de reactivo a 1.2 ml/min.

Los resultados, representados en la figura 30, muestran que para una relación de caudal de fase orgánica/portador 0.4, correspondiente a un caudal de fase orgánica de 0.6 ml/min, se obtiene la mejor señal analítica, separándose totalmente las dos fases, por lo que fue seleccionada como óptima para posteriores estudios.

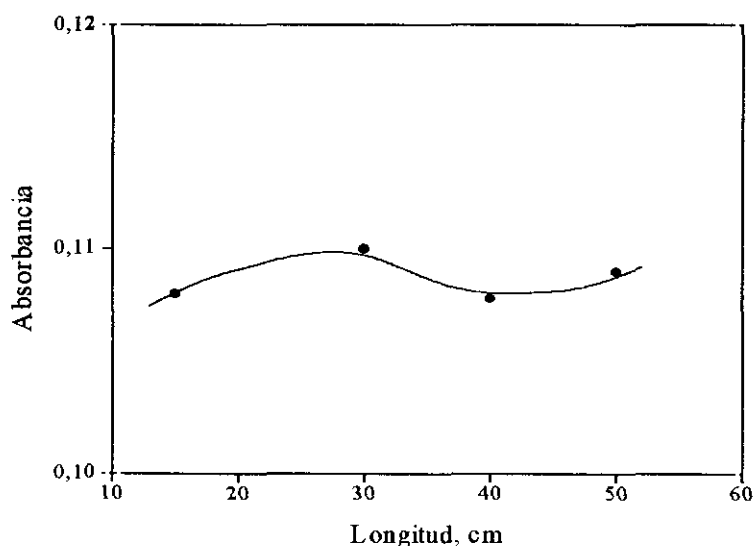


$\lambda=336$ nm, [PCF]=10 mg/L, [TBA]=500 mg/L, $L_{\text{reactor}}=15$ cm, $L_{\text{extractor}}=60$ cm, $\phi=0.5$ mm, $V_{\text{iny}}=250$ μL , $q_{\text{portador}}=1.5$ ml/min, $q_{\text{TBA}}=1.2$ ml/min.

Fig. 30.- Influencia de la relación de caudales $q_{\text{disolvente}}/q_{\text{portador}}$ sobre la altura del pico FIA del sistema pentaclorofenol-TBA

D.2.1.d. Longitud del reactor y del bucle de extracción

Se ha estudiado la influencia de la longitud del reactor sobre la intensidad de la señal analítica ensayándose reactores de longitud comprendida entre 15 y 50 cm. Los resultados experimentales, representados en la figura 31, muestran que la señal analítica no varía de forma significativa con el aumento de la longitud del reactor, eligiéndose, por tanto, una longitud de 30 cm que proporciona una velocidad de muestreo aceptable, así como una ligera mejora en la señal.

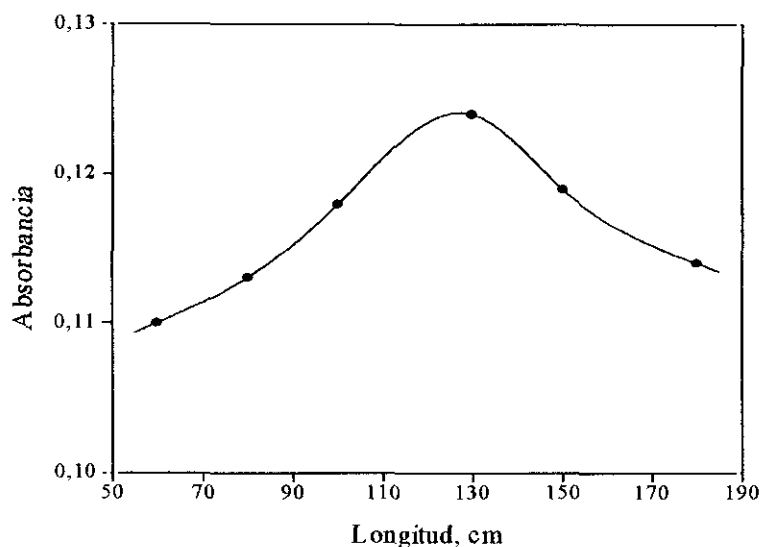


$\lambda=336$ nm, [PCF]=10 mg/L, [TBA]=500 mg/L, $L_{\text{extractor}}=60$ cm, $\phi=0.5$ mm,
 $V_{\text{iny}}=250$ μ l, $q_{\text{portador}}=1.5$ ml/min, $q_{\text{TBA}}=1.2$ ml/min, $q_{\text{disolvente}}=0.6$ ml/min.

Fig. 31.- Influencia de la longitud del reactor sobre la altura del pico FIA del sistema pentaclorofenol-TBA

Por otra parte, se ha estudiado también la influencia de la longitud del bucle de extracción, ensayándose longitudes entre 60 y 180 cm. Los resultados, representados en la figura 32, muestran que la señal analítica aumenta hasta una

longitud de 130 cm a partir de la cual disminuye debido, probablemente, a la pérdida de eficacia del separador de fases, y al aumento de la dispersión del analito. Se eligió, por tanto, una longitud de 130 cm, como óptima, para el bucle de extracción.



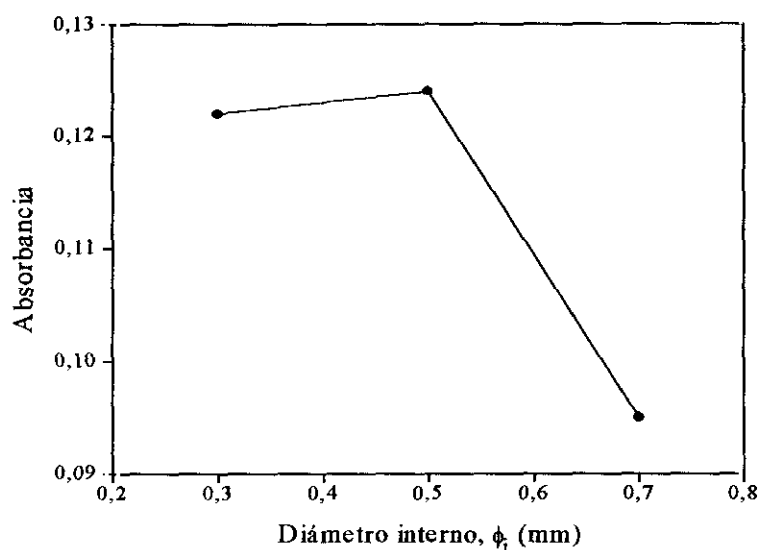
$\lambda=336$ nm, [PCF]=10 mg/L, [TBA]=500 mg/L, $L_{\text{reactor}}=30$ cm, $\phi=0.5$ mm, $V_{\text{iny}}=250$ μ l, $q_{\text{portador}}=1.5$ ml/min, $q_{\text{TBA}}=1.2$ ml/min, $q_{\text{disolvente}}=0.6$ ml/min.

Fig. 32.- Influencia de la longitud del bucle de extracción sobre la altura del pico FIA del sistema pentaclorofenol-TBA

D.2.1.e. Diámetro interno del reactor y del bucle de extracción

Otra variable física del sistema FIA que ha sido estudiada, es el diámetro interno de los reactor y bucle de extracción. Se han estudiado los diámetros existentes en el mercado, de 0.3, 0.5 y 0.7, considerando las longitudes, optimizadas anteriormente, de 30 cm para el reactor y 130 cm para el bucle de extracción.

Los resultados experimentales, representados en la figura 33, muestran que apenas hay un ligero aumento de la señal entre 0.3 y 0.5 mm, mientras que con 0.7 mm la señal analítica disminuye apreciablemente. Se eligió 0.3 mm como diámetro interno ya que este diámetro permite una mayor velocidad de muestreo (76 muestras/h).



$\lambda=336$ nm, [PCF]=10 mg/L, [TBA]=500 mg/L, $L_{\text{reactor}}=30$ cm, $L_{\text{extractor}}=130$ cm,
 $V_{\text{iny}}=250$ μ l, $q_{\text{portador}}=1.5$ ml/min, $q_{\text{TBA}}=1.2$ ml/min, $q_{\text{disolvente}}=0.6$ ml/min.

Fig. 33.- Influencia del diámetro interno del reactor y del bucle de extracción sobre la altura del pico FIA del sistema pentaclorofenol-TBA

D.2.2. Optimización de las variables químicas

Tras el estudio de las variables hidrodinámicas, se pasó al estudio de las químicas, estudiándose la influencia que sobre la señal analítica tiene el pH, la fuerza iónica del portador y la concentración de nitrato de tetrabutilamonio (TBA). Los caudales empleados así como las características del reactor y bucle de extracción han sido los optimizados en el apartado D.2.1.

D.2.2.a. Influencia del pH

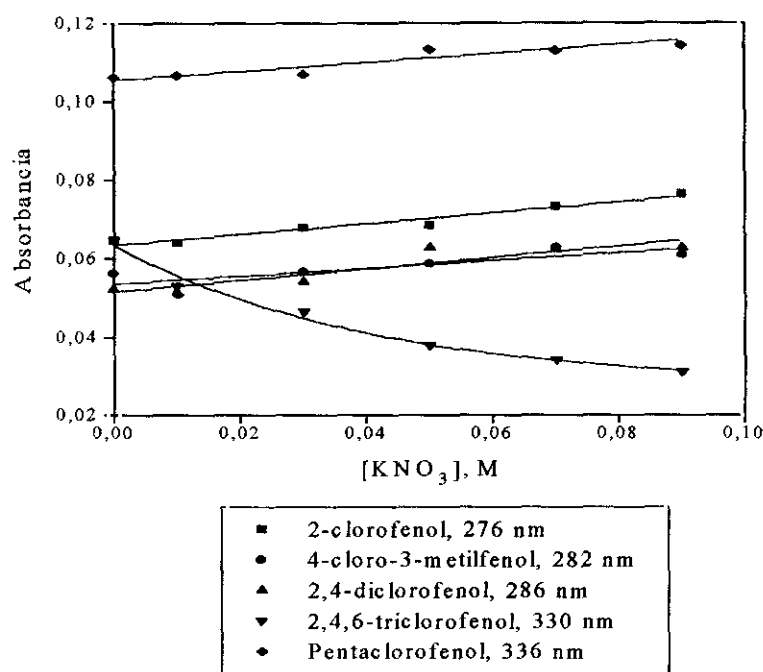
Se ha estudiado la influencia del pH en la extracción de los clorofenoles en el intervalo 4.7-12. Los resultados obtenidos fueron similares a los del método manual, es decir, a pH 4.7 los clorofenoles se extraen de forma neutra, excepto el pentaclorofenol que empieza a extraerse como par iónico, mientras que a medida que vamos aumentando el pH el 2,4,6-triclorofenol se extrae como par iónico y solo a pH 12 el 2,4-diclorofenol se extrae también como par iónico. Sin embargo, a medida que aumenta el pH, el 2-clorofenol y el 4-cloro-3-metilfenol se extraen en menor cuantía, por lo que se eligió el pH 9.1, al igual que en el método manual, como pH de compromiso al cual el 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol se extraen en forma de par iónico, mientras que el 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol y 2,4-diclorofenol se extraen en forma neutra.

D.2.2.b. Influencia de la fuerza iónica

Un aspecto que se ha considerado en el estudio y puesto a punto del método FIA ha sido la influencia que la fuerza iónica del portador tiene sobre el equilibrio de extracción de cada uno de los clorofenoles. Dicha fuerza iónica es fijada mediante la adición de sales, electrólitos fuertes en el portador (disolución reguladora bórico/borato a pH 9.1). Las sales empleadas para este estudio han sido el KNO_3 y el NaCl en el intervalo de concentración 0-0.09M.

Se estudió en primer lugar la extracción de los clorofenoles en presencia de KNO_3 cuyos resultados, representados en la figura 34, muestran que a medida que aumenta la concentración de dicha sal, la señal analítica aumenta ligeramente en todos los clorofenoles, excepto para el 2,4,6-triclorofenol que disminuye; no llegando en ninguno de los casos a alcanzar un valor constante. Igualmente, se observó que la extracción del 2,4,6-triclorofenol es la más afectada por la

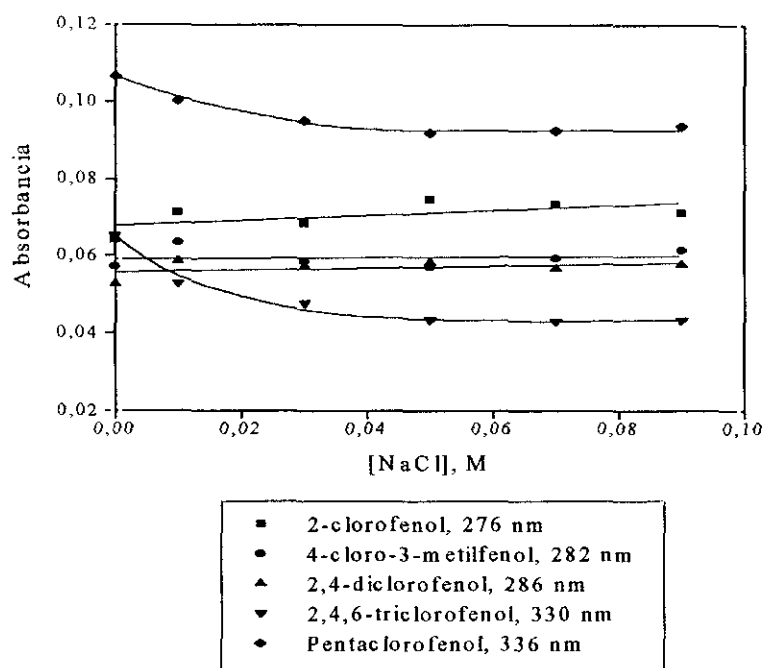
presencia de KNO_3 , aumentando la cantidad de este clorofenol que se extrae en forma neutra a medida que aumenta la concentración de KNO_3 , lo que hace que la señal analítica correspondiente a la extracción del par iónico disminuya.



$\lambda=336$ nm, $[\text{CF}]=10$ mg/L, $[\text{TBA}]=500$ mg/L, $L_{\text{reactor}}=30$ cm, $L_{\text{extractor}}=130$ cm, $\phi=0.3$ mm $V_{\text{iny}}=250$ μl , $q_{\text{portador}}=1.5$ ml/min, $q_{\text{TBA}}=1.2$ ml/min, $q_{\text{disolvente}}=0.6$ ml/min.

Fig. 34.- Influencia de la fuerza iónica (KNO_3) sobre la altura del pico FIA del sistema clorofenol-TBA

Los resultados obtenidos en presencia de NaCl , representados en la figura 35, muestran que únicamente la extracción del pentaclorofenol y el 2,4,6-triclorofenol se ve afectada por la fuerza iónica del portador, siendo la señal analítica prácticamente constante a partir de una concentración de 0.05M de NaCl , la cual fue seleccionada para posteriores estudios.



$\lambda=336$ nm, $[CF]=10$ mg/L, $[TBA]=500$ mg/L, $L_{\text{reactor}}=30$ cm, $L_{\text{extractor}}=130$ cm
 $\phi=0.3$ mm $V_{\text{iny}}=250$ μ l, $q_{\text{portador}}=1.5$ ml/min, $q_{TBA}=1.2$ ml/min, $q_{\text{disolvente}}=0.6$ ml/min.

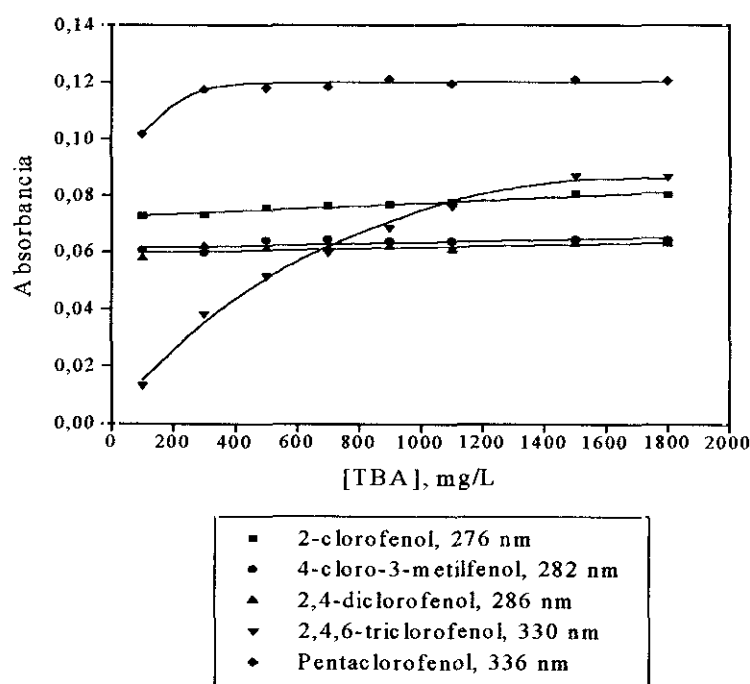
Fig. 35.- Influencia de la fuerza iónica (NaCl) sobre la altura del pico FIA del sistema clorofenol-TBA

D.2.2.c. Influencia de la concentración de TBA

Como se puso de manifiesto en los estudios referentes al método manual para la determinación extractivo-espectrofotométrica multicomponente de clorofenoles (capítulo D.1.), el TBA favorece la extracción en cloroformo de los clorofenoles ya sea en forma neutra, o mediante la formación del correspondiente par iónico clorofenol-TBA, debiendo siempre estar en exceso.

Puesto que el efecto de la concentración no tiene por que ser el mismo en el método manual que en FIA, se procedió a estudiar de nuevo esta variable química. Los resultados experimentales, representados en la figura 36, muestran

que para el 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol y 2,4-diclorofenol, los cuales se extraen en forma neutra mayoritariamente, la señal analítica es independiente de la concentración de TBA en el intervalo de concentración comprendido entre 100 y 1800 mg/L. La señal analítica correspondiente a la extracción del par iónico pentaclorofenol-TBA solo se ve afectada a concentraciones muy bajas de TBA, mientras que la extracción del par iónico 2,4,6-triclorofenol-TBA es el que presenta una mayor variación en función de la concentración de TBA. Como se puede observar a partir de 1500 mg/L de TBA la señal analítica presenta un valor prácticamente constante para este último caso, eligiéndose dicha concentración de TBA para posteriores estudios.



$\lambda=336$ nm, $[CF]=10$ mg/L, $[TBA]=500$ mg/L, $L_{\text{reactor}}=30$ cm, $L_{\text{extractor}}=130$ cm
 $\phi_i=0.3$ mm $V_{\text{iny}}=250$ μ l, $q_{\text{portador}}=1.5$ ml/min, $q_{TBA}=1.2$ ml/min, $q_{\text{disolvente}}=0.6$ ml/min.

Fig. 36.- Influencia de la concentración de TBA sobre la altura del pico FIA del sistema clorofenol-TBA

En la tabla XXVII se resumen las condiciones experimentales seleccionadas para la extracción FIA de cada uno de los clorofenoles, obtenidas a partir del estudio de las diferentes variables hidrodinámicas y químicas realizado en los apartados anteriores. Los espectros obtenidos de cada uno de los clorofenoles bajo estas condiciones se muestran en la figura 37.

TABLA XXVII. Condiciones experimentales seleccionadas. Método FIA.

Variable	Intervalo	Seleccionado
Variables hidrodinámicas:		
Volumen de inyección (μl)	50-500	250
Caudal (ml/min):		
Portador	0.8-3.0	1.5
Reactivo (TBA)	0.8-1.5	1.2
Fase orgánica (CHCl_3)	0.4-1.5	0.6
Reactor:		
Longitud (cm)	15-50	30
Diámetro interno (mm)	0.3-0.7	0.3
Bucle de extracción:		
Longitud (cm)	60-180	130
Diámetro interno (mm)	0.3-0.7	0.3
Variables químicas:		
pH	4.7-12	9.1
Fuerza iónica (NaCl, M)	0.00-0.09	0.05
[TBA], mg/L	100-1800	1500

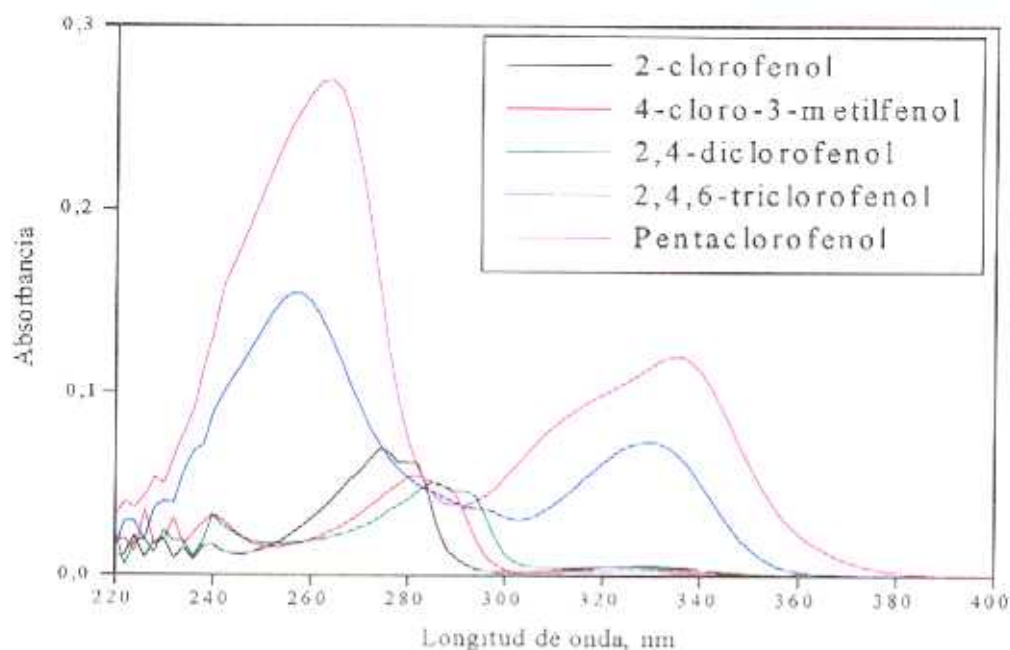


Fig. 37 - Espectros de extracción de los clorofenoles en las condiciones seleccionadas del sistema FIA (Tabla XXVII)

D.2.3. Determinación de clorofenoles mediante calibración multivariante por FIA y espectrofotometría derivada

Una vez optimizadas las diferentes variables del sistema FIA, se procedió a la determinación conjunta de los clorofenoles contaminantes prioritarios 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol, mediante la aplicación de cinco métodos de calibración multivariante, CLS, ILS, KF, PCR y PLS. El procedimiento seguido para la obtención de los espectros correspondientes, tanto de las mezclas de calibración como de validación, se encuentra descrito en el apartado C.4.2.a. La tabla XXVIII muestra el diseño de calibración empleado; y la tabla XXIX el de validación.

TABLA XXVIII. Composición de las mezclas de calibración (mg/L). Método FIA.

Clorofenol	Mezcla																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
2CF	2.0	3.9	6.1	8.1	10.0	10.0	8.1	10.0	8.1	8.1	2.0	6.1	10.0	8.1	2.0	2.0	6.1	2.0	10.0	6.1	6.1	2.0	7.9	7.9	0.0
4C3MF	2.0	4.0	5.9	7.9	9.9	6.1	9.9	9.9	7.9	4.0	4.0	9.9	4.0	4.0	2.0	4.0	7.9	2.0	4.0	4.0	8.1	4.3	6.1	2.0	2.0
DCF	1.9	4.1	6.0	7.9	10.1	4.1	1.9	1.9	4.1	6.0	10.1	7.9	6.0	1.9	10.1	1.9	7.9	6.0	7.9	4.1	2.0	6.0	10.0	0.0	8.2
TCF	2.1	4.0	6.1	7.9	10.0	6.1	6.1	10.0	6.1	10.0	6.1	7.9	10.0	2.1	10.0	2.1	10.0	6.1	4.0	7.9	0.0	6.0	6.0	6.0	10.2
PCF	2.0	3.9	6.1	8.1	10.0	8.1	3.9	3.9	2.0	6.1	10.0	6.1	8.1	3.9	6.1	8.1	6.1	6.1	8.1	10.0	4.0	0.0	0.0	4.0	6.0

Clorofenol	Mezcla																								
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
2CF	0.0	2.0	10.2	4.1	7.9	0.0	4.1	0.0	7.9	0.0	4.1	0.0	2.0	4.1	7.9	2.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	4.1
4C3MF	6.1	9.9	0.0	6.1	0.0	2.0	8.1	0.0	9.9	2.0	6.1	6.1	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0	2.0	9.9	0.0	0.0	9.9	0.0	0.0
DCF	10.0	2.0	8.0	0.0	2.0	6.0	6.0	10.0	0.0	6.0	0.0	0.0	4.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	10.0	6.0	0.0	0.0	6.0
TCF	2.0	0.0	4.0	10.2	4.0	0.0	0.0	8.2	0.0	4.0	8.2	8.2	0.0	6.0	6.0	4.0	0.0	0.0	8.2	0.0	0.0	4.0	0.0	6.0	0.0
PCF	4.0	8.0	2.0	2.0	6.0	10.0	0.0	4.0	6.0	0.0	0.0	2.0	6.0	4.0	0.0	0.0	2.0	6.0	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	2.0	0.0

TABLA XXIX. Composición de las mezclas de validación (mg/L). Método FIA.

Clorofenol	Mezcla																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
2CF	4.0	4.0	3.9	6.0	4.0	4.0	10.0	8.0	10.0	10.0	7.9	2.0	4.1	4.1	0.0	4.1	7.9	6.1	0.0	0.0	7.9	10.2	10.2	2.0	0.0
4C3MF	6.0	6.0	2.0	10.0	8.0	8.0	5.9	6.0	5.9	7.9	0.0	4.3	9.9	6.1	2.0	8.1	0.0	0.0	8.1	4.3	2.0	4.3	0.0	4.3	4.3
DCF	2.0	8.2	6.0	10.2	4.0	2.0	6.0	4.0	6.0	1.9	6.0	6.0	8.0	0.0	2.0	6.0	0.0	2.0	10.0	8.0	0.0	0.0	2.0	8.0	0.0
TCF	2.0	10.3	4.0	6.0	8.3	6.0	7.9	4.0	6.1	10.0	4.0	2.0	0.0	2.0	8.2	0.0	2.0	0.0	2.0	0.0	0.0	2.0	8.2	0.0	6.0
PCF	4.0	6.0	10.0	8.2	4.0	10.2	2.0	10.2	2.0	3.9	10.0	0.0	2.0	8.0	4.0	0.0	6.0	4.0	0.0	6.0	4.0	0.0	0.0	0.0	8.0

	Mezcla											
Clorofenol	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
2CF	0.0	0.0	6.1	0.0	7.9	6.1	0.0	0.0	6.1	0.0	4.1	
4C3MF	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0	4.3	6.1	6.1	0.0	0.0	0.0	
DCF	8.2	2.0	0.0	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0	4.0	6.0	
TCF	2.0	8.2	0.0	0.0	6.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	
PCF	4.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	8.0	0.0	0.0	6.0	0.0	

D.2.3.a. Selección del intervalo de longitudes de onda

A partir de los estudio previos realizados para poner a punto el método manual, se deduce que una adecuada selección previa de longitudes de onda, ya sea mediante el número de condición ($\text{cond}(\mathbf{K})$) o la relación S/N, hace aumentar la precisión y exactitud de todos los métodos estudiados, con respecto al empleo del espectro completo. Puesto que ambos criterios no mostraron diferencias significativas en los resultados obtenidos al aplicarlos en los métodos de calibración multivariante estudiados, excepto en el ILS (tabla XXVI), se eligió el número de condición del intervalo de longitud de onda como criterio de selección en este caso.

El cálculo del número de condición de la matriz de calibración ($\text{cond}(\mathbf{K})$) para diferentes intervalos de longitud de onda se realizó a partir de la matriz \mathbf{K} obtenida mediante calibración multivariante de regresión clásica de mínimos cuadrados (CLS). Esta matriz \mathbf{K} , que también puede ser obtenida mediante calibración multivariante con filtro de Kalman (KF), muestra similares valores del $\text{cond}(\mathbf{K})$, como quedó demostrado en el apartado D.1.4.b. del método manual (tabla XXII), donde se aprecia similares tendencias en la variación de este en función del intervalo de longitud de onda.

Las figuras 38 y 39 muestran los resultados de la variación del $\text{cond}(\mathbf{K})$ en función de los intervalos de longitud de onda que presentan un menor valor de dicho parámetro. La figura 38 muestra la variación del $\text{cond}(\mathbf{K})$ para el intervalo comprendido entre el valor indicado en abscisas, que corresponde al límite inferior, y 338 nm que corresponde al límite superior del intervalo y que se mantiene constante. La figura 39 muestra nuevamente la variación del $\text{cond}(\mathbf{K})$ pero ahora para intervalos de longitud de onda crecientes, en los cuales el límite inferior es siempre 286 nm y el superior el indicado en el eje de abscisas.

Ambas figuras presentan un valor mínimo, y por consiguiente óptimo, del número de condición para el intervalo de longitud de onda comprendido entre 286-338 nm.

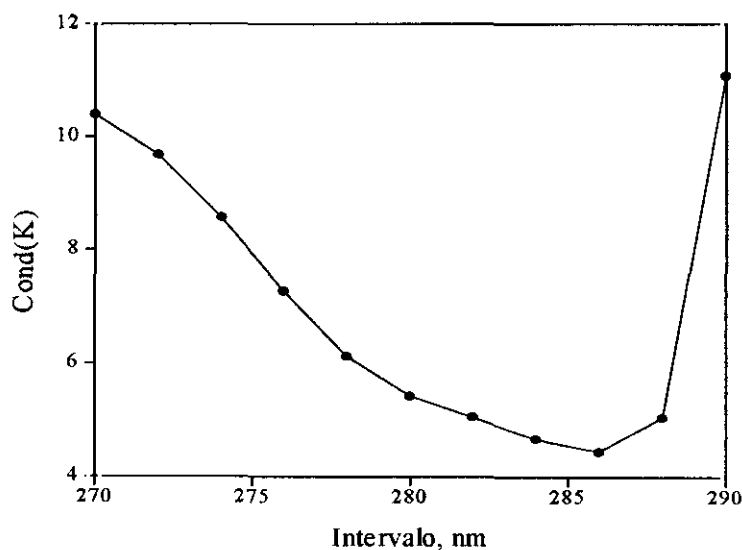


Fig. 38.- Variación del número de condición (cond(K)) para diferentes intervalos de longitud de onda. (Cada intervalo corresponde al comprendido entre el número indicado en abscisas y 338 nm).

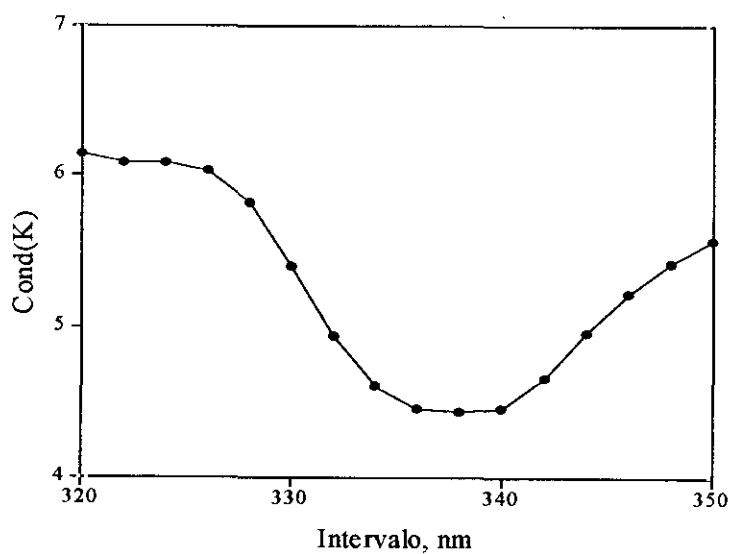


Fig. 39.- Variación del número de condición (cond(K)) para diferentes intervalos de longitud de onda. (Cada intervalo corresponde al comprendido entre 286 nm y el número indicado en abscisas)

D.2.3.b. Selección del número de factores en PCR y PLS

Uno de los pasos previos para la aplicación de los métodos PCR y PLS es la selección del número óptimo de factores o variables latentes. En este trabajo dicha selección se llevó a cabo mediante la aplicación del método de validación de cruce, para lo cual se consideraron diferentes grupos de mezclas y los criterios de selección propuestos por Osten (429), Eastment y Krzanowski (428) y Haaland y Thomas (528), así como la variación de la suma cuadrática de los errores residuales de predicción (PRESS) frente al número de factores.

Los resultados se muestran en las figuras 40 a 43 para el caso del PCR y en las figuras 44 a 47 para el PLS, que como puede observarse son prácticamente similares para ambos métodos. Atendiendo a los criterios propuestos por Osten (estadístico **F**) y Eastment y Krzanowski (**Wa**), ambos criterios dan resultados análogos, independientemente del número de grupos de mezclas seleccionados en la validación de cruce, siendo el número óptimo de factores igual a 6 tanto para el PCR como para el PLS, valor éste que corresponde con el primer mínimo local del valor del PRESS (figuras 40 y 44), con el primer valor del estadístico **F** inferior al valor crítico según el criterio propuesto por Osten (figuras 42 y 46) y con el factor anterior al primero que presenta un valor de **Wa** inferior a 1 (criterio de Eastment y Krzanowski) (figuras 41 y 45).

Por otra parte, los resultados obtenidos empleando el estadístico **F** propuesto por Haaland y Thomas son función del número de grupos de mezclas seleccionados en la validación de cruce, siendo el valor de este estadístico mayor cuanto mayor es el número de grupos de mezclas para ambos métodos de calibración. En el caso del PCR (figura 43) y considerando el nivel de confianza del 75% ($\alpha=0.25$) propuesto por estos autores, se observa que únicamente en el caso de 5 y 10 grupos de mezclas el valor calculado de este estadístico **F** es

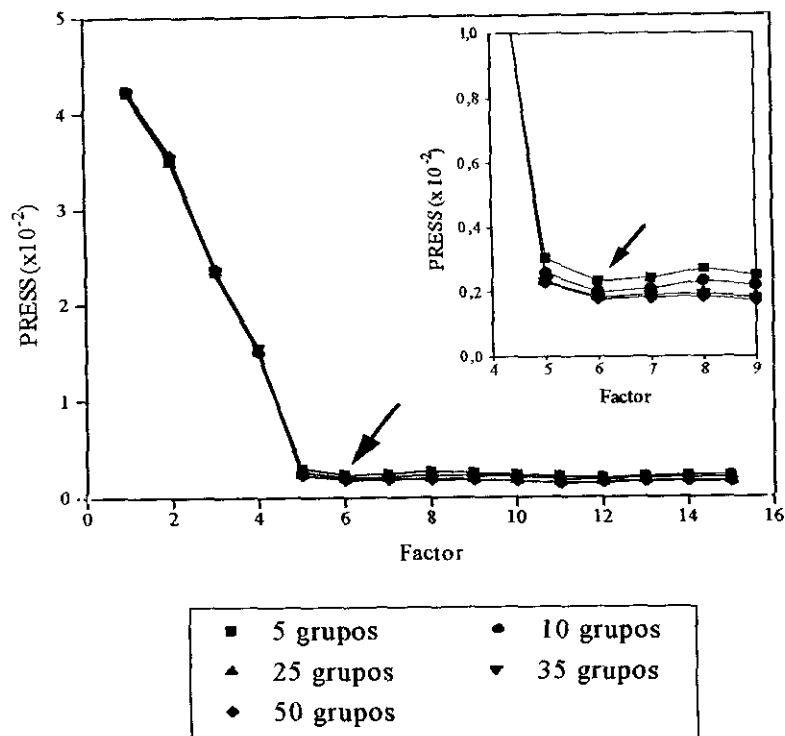


Fig. 40.- Variación del PRESS en función del número de factores para el PCR.

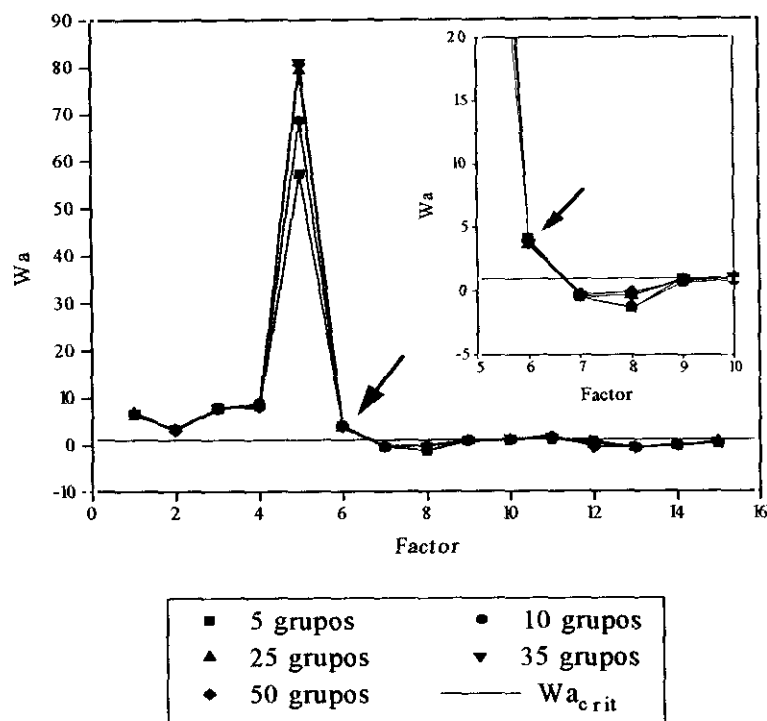


Fig. 41.- Variación del parámetro de Eastment y Krzanowski (W_a) en función del número de factores para el PCR.

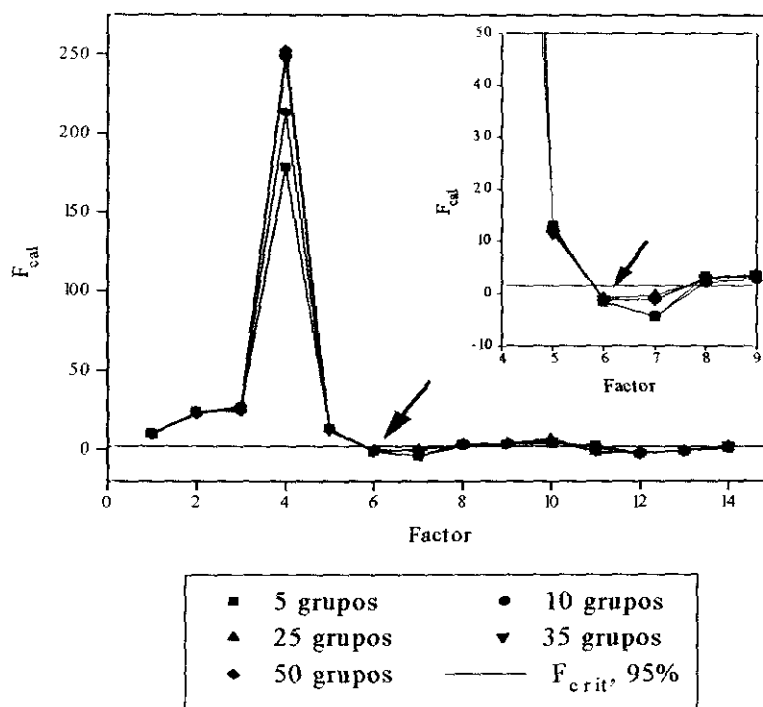


Fig. 42.- Variación del estadístico F de Osten en función del número de factores para el PCR.

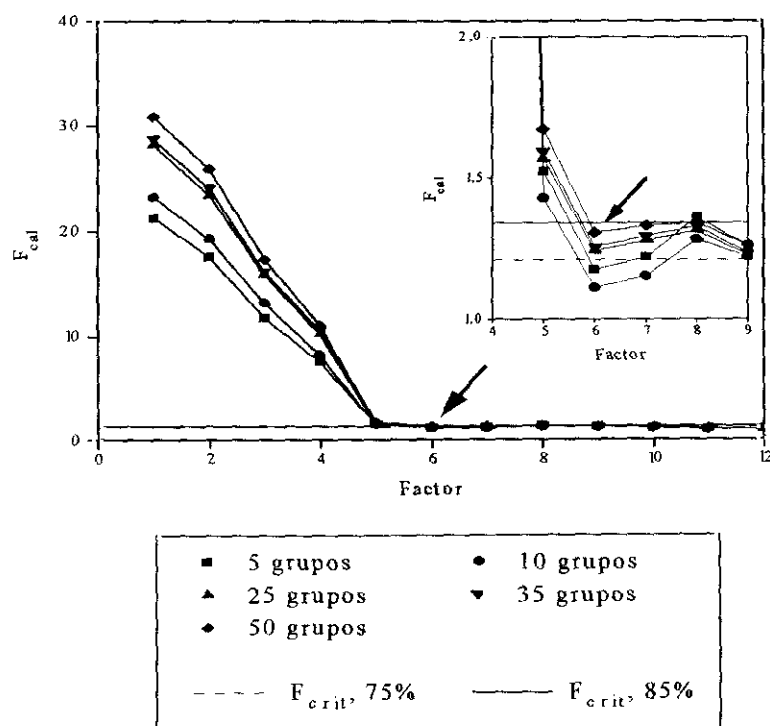


Fig. 43.- Variación del estadístico F de Haaland y Thomas en función del número de factores para el PCR.

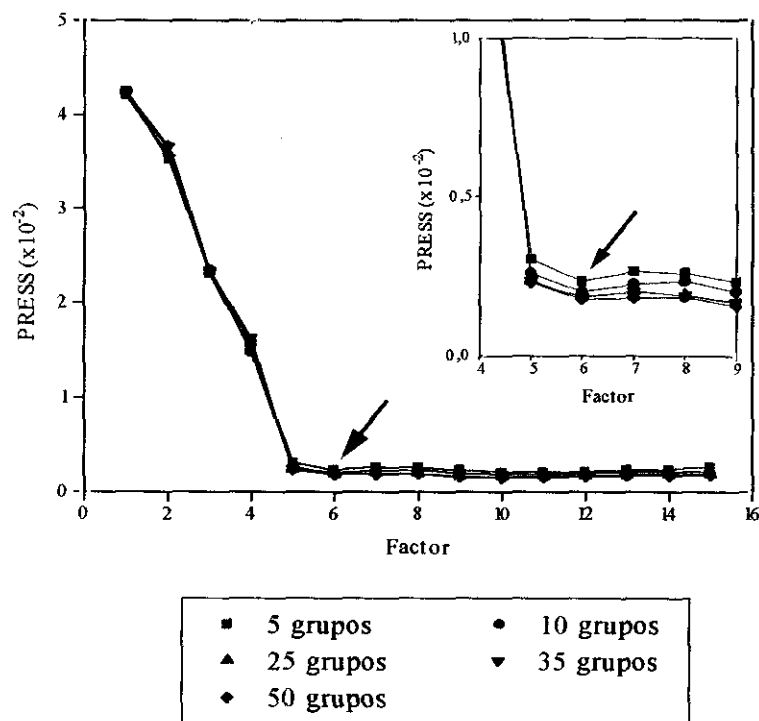


Fig. 44.- Variación del PRESS en función del número de factores para el PLS.

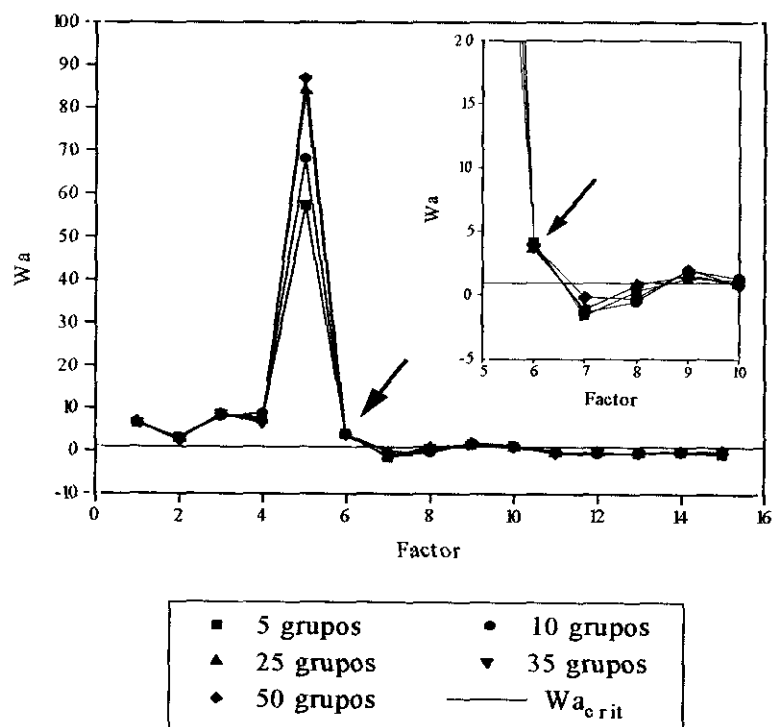


Fig. 45.- Variación del parámetro de Eastment y Krzanowski (W_a) en función del número de factores para el PLS.

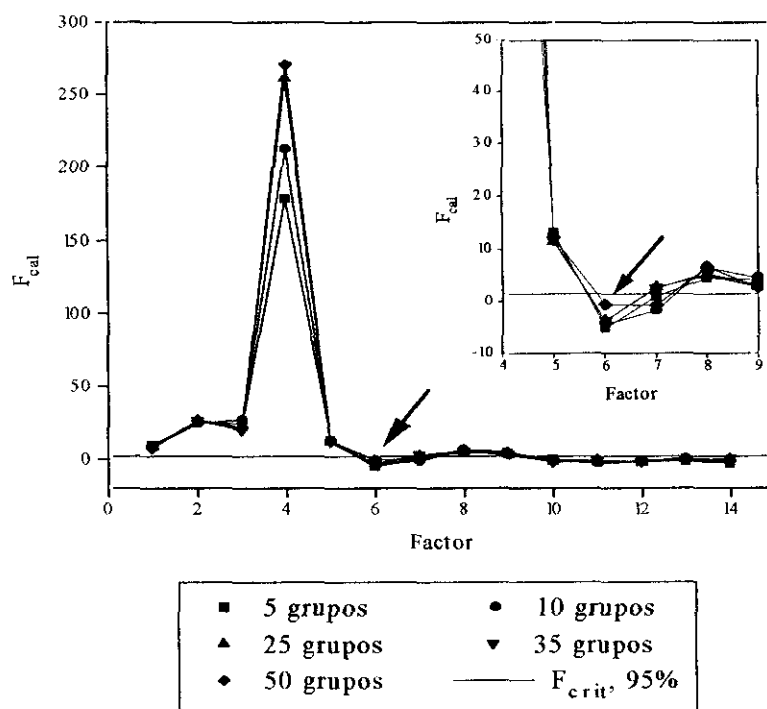


Fig. 46.- Variación del estadístico F de Osten en función del número de factores para el PLS.

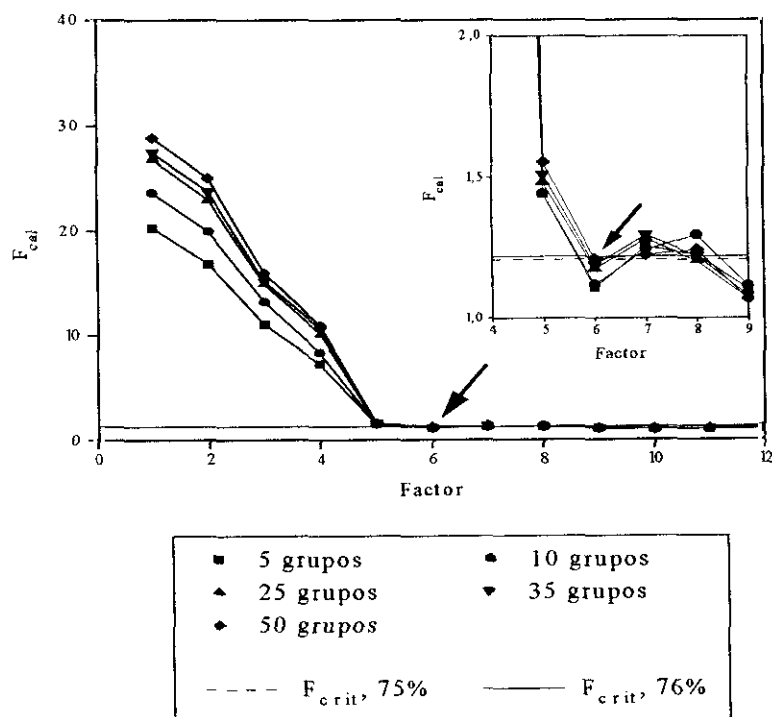


Fig. 47.- Variación del estadístico F de Haaland y Thomas en función del número de factores para el PLS.

menor que el valor teórico cuando el número de factores es el óptimo según los otros criterios. Sin embargo, y como señalan estos autores, la elección de dicho nivel de confianza es completamente arbitrario por lo que se estudió otros niveles de confianza, observándose que es necesario aumentar hasta un 85% ($\alpha=0.15$) para que el valor de F seleccionando 50 grupos de mezclas, que significa eliminar una única mezcla cada vez, sea inferior al valor teórico. Para el caso del PLS (figura 47) se observa que a partir de un nivel de confianza del 76% ($\alpha=0.24$) el valor calculado del estadístico F es menor que el teórico para todos los grupos de mezclas, el cual es prácticamente igual al propuesto por Haaland y Thomas.

En definitiva, de lo anteriormente expuesto, se puede concluir que el número de factores óptimo tanto para el PCR como para el PLS es en ambos casos igual a 6, ya que este valor es el que se obtiene siguiendo tanto el criterio de Osten como el de Eastment y Krzanowski. En cuanto al criterio de Haaland y Thomas este número de factores no se obtiene para todos los grupos de mezclas, salvo que se considere un nivel de confianza algo mayor del recomendado por estos autores.

D.2.3.c. Detección de mezclas de calibración que se encuentran fuera del intervalo muestral (“outliers”)

Se buscó la posible presencia de mezclas de calibración que no se encuentran fuera del intervalo muestral, también conocidas como “outliers”. Como es sabido, cualquier procedimiento que se aplique para buscar “outliers”, debe ofrecer la protección necesaria para evitar declarar muchos casos como tales “outliers”. Esto hace que sea recomendable el uso simultáneo de diferentes parámetros y tests estadísticos. En este caso se han considerado el efecto leva, los residuales de Student y la distancia de Cook.

El efecto leva o “leverage” (h_i) es un parámetro muy utilizado, que consiste en una estimación de la distancia relativa de la señal analítica obtenida para cada una de las mezclas de calibración al centro del conjunto de dichas mezclas. Formalmente hablando, el efecto leva es define como la distancia de Mahalanobis que, para el caso de los métodos de calibración multivariante CLS, ILS y KF viene dada por la expresión:

$$h_i = \mathbf{a}_i^T (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{a}_i$$

donde \mathbf{a}_i es la señal analítica de una determinada mezcla de calibración y \mathbf{A} es la matriz de señales analíticas que incluye todas las mezclas de calibración. En el caso particular del PCR y PLS, este efecto leva viene dado por la expresión:

$$h_i = \frac{1}{m} + \mathbf{t}_i^T (\mathbf{T}^T \mathbf{T})^{-1} \mathbf{t}_i$$

donde \mathbf{t}_i es el vector de “scores” de una determinada mezcla, \mathbf{T} es la matriz de “scores” del conjunto de calibración y m es el número total de mezclas de calibración. Un valor pequeño del efecto leva significa que la mezcla está cerca del centro del conjunto de calibración, mientras que un valor alto del efecto leva, debido posiblemente a un valor extremo de la señal analítica, significa que dicha mezcla se encuentra lejos del centro, por lo que puede tener un gran efecto sobre el resultado final de la estimación de la concentración. Por definición el efecto leva se encuentra en el intervalo comprendido entre $1/m$ y 1, es decir, $1/m < h_i < 1$, mientras que su valor medio es p/m donde p es el número de longitudes de onda seleccionadas en el caso del CLS, ILS y KF, o el número de factores seleccionados en el caso del PCR y PLS. En la figura 48 se muestra el valor de h_i para cada una de las mezclas utilizadas la etapa de calibración (tabla XXVIII), para el caso de los métodos de calibración multivariante CLS,

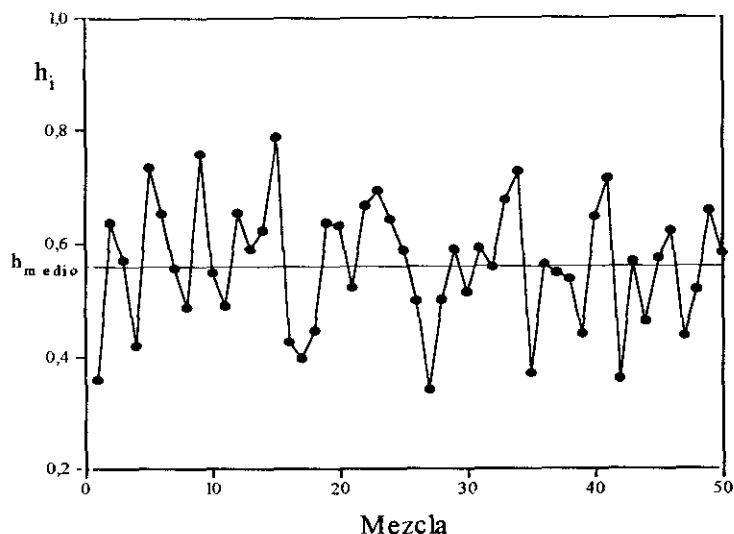


Fig. 48.- Efecto leva de cada mezcla de calibración para los métodos de calibración multivariante CLS, ILS y KF

ILS y KF, observándose que todos los valores se encuentran alrededor de la media, no apreciándose valores muy extremos.

En el caso del PCR y PLS, debido a sus características especiales, este efecto leva suele representarse frente a la varianza residual espectral de cada una de las mezclas (358), la cual viene dada por la expresión:

$$s(e_i)^2 = \sum_{k=1}^l e_{ik}^2 / (df/m)$$

donde e_{ik} representan los residuales espectrales de cada mezcla de calibración y df son los grados de libertad del modelo, que en este caso vienen dados por $df=(l-f)(m-f-1)$, siendo l el número de longitudes de onda y f el número de factores utilizados en el modelo. En las figuras 49 y 50 se representan el efecto leva frente a la varianza residual para el caso del PCR y PLS, respectivamente.

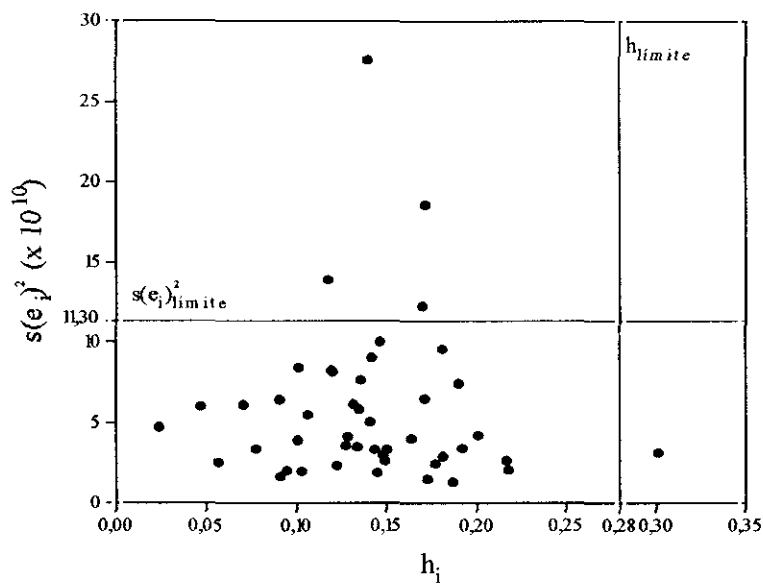


Fig. 49.- Efecto leva y varianza residual espectral de cada mezcla de calibración para el PCR

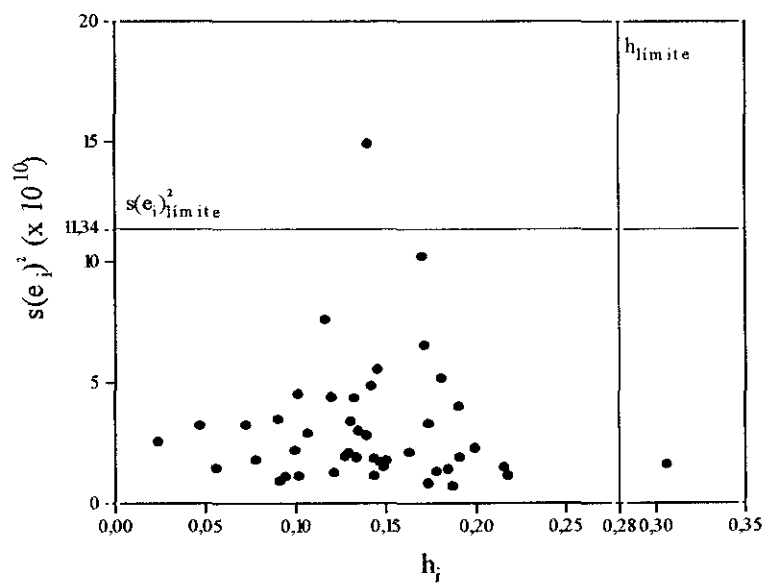


Fig. 50.- Efecto leva y varianza residual espectral de cada mezcla de calibración para el PLS

En estas figuras se representan, igualmente, los valores límites tanto para el efecto leva como para la varianza residual a partir de los cuales se pueden considerar que una mezcla es anómala desde el punto de vista espectral. Dichos valores límites vienen dados por:

$$h_i > 2p/m$$

$$s(e_i)^2 > 2s(e)^2$$

donde $s(e)^2$ es la varianza residual espectral total que viene dada por:

$$s(e)^2 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^l e_{ij}^2 / df$$

A partir de estas figuras, se puede observar que en el caso del PCR cuatro de las mezclas presentan un valor grande de la varianza residual y una presenta un valor del efecto leva superior al valor límite, mientras que en el caso del PLS solo una mezcla presenta un valor alto de la varianza residual mientras que otra tiene un valor del efecto leva también superior al valor crítico, no encontrándose en ningún caso, ninguna mezcla que presente ambos parámetros superiores a su valor límite; de haber ocurrido así, esas mezclas habrían sido consideradas fuera del intervalo muestral (“outliers”).

No obstante, la búsqueda de posibles “outliers” se suele realizar a partir de los residuales, ya sean de la señal analítica para los métodos clásicos (CLS y KF) como de la concentración para los métodos inversos (ILS, PCR y PLS). En este sentido, se estudio un parámetro conocido como residual de Student (376,385). Dicho residual, obtenido para cada mezcla, se compara con la distribución t de Student a un determinado nivel de confianza. Existen dos tipos de residual de Student, denominados residual interno (r_i) y residual externo (t_i), los cuales están interrelacionados y vienen dados por las expresiones:

$$r_i = \frac{|\hat{e}_i|}{\sigma \sqrt{1-h_i}}$$

$$t_i = r_i \left(\frac{m-p-1}{m-p-r_i^2} \right)^{1/2}$$

donde \hat{e}_i es el residual de cada mezcla, expresado como $c_i - \hat{c}_i$ para los métodos ILS, PCR y PLS y como $a_i - \hat{a}_i$ para el CLS y KF y σ es el error estándar de dichos residuales.

El residual externo de Student es el que normalmente se compara con la distribución t . En las figuras 51 a 55 se muestran los valores de t_i de cada mezcla para los métodos CLS, ILS, KF, PCR y PLS, respectivamente. En todos los casos se puede observar que dichos residuales externos de Student se encuentran por debajo del valor crítico al nivel de confianza del 95% y, como consecuencia, ninguna de las mezclas presenta desviaciones anómalas desde el punto de vista de la concentración. Por otra parte, se puede observar la gran similitud entre los resultados obtenidos mediante PCR y PLS.

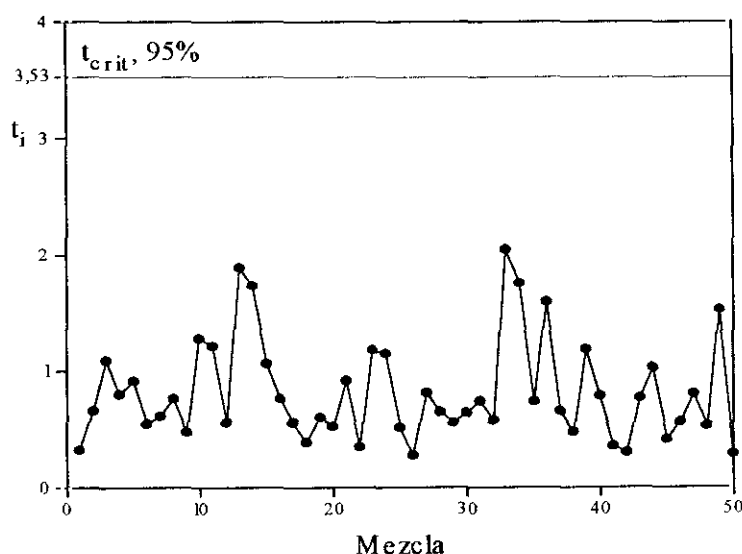


Fig. 51.- Residual externo de Student de cada mezcla de calibración para el método CLS.

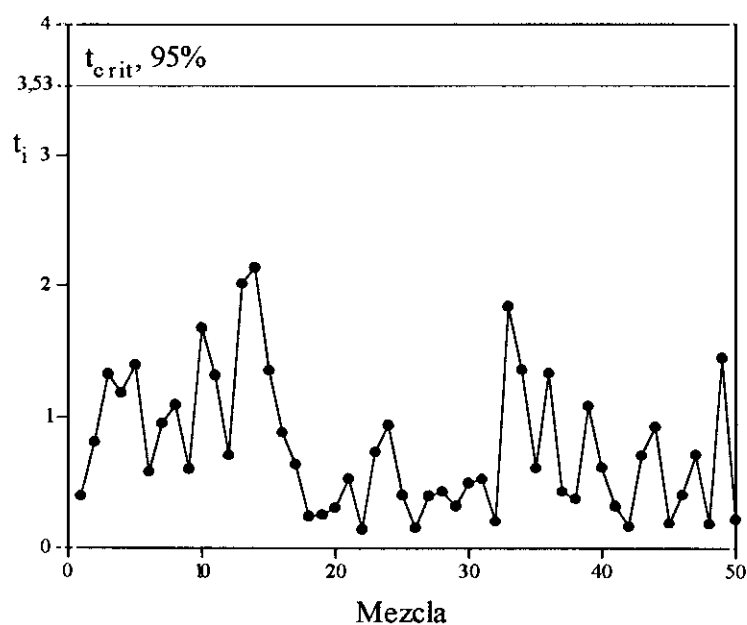


Fig. 52.- Residual externo de Student de cada mezcla de calibración para el método KF.

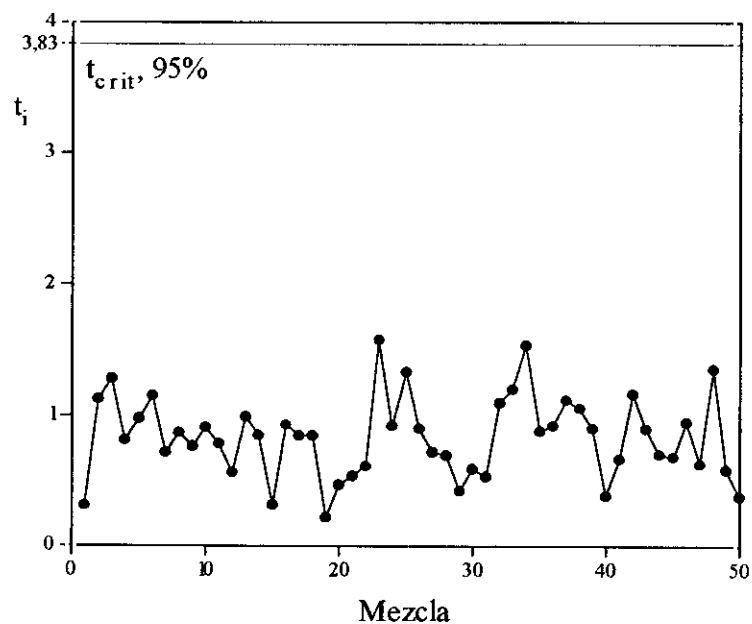


Fig. 53.- Residual externo de Student de cada mezcla de calibración para el método ILS.

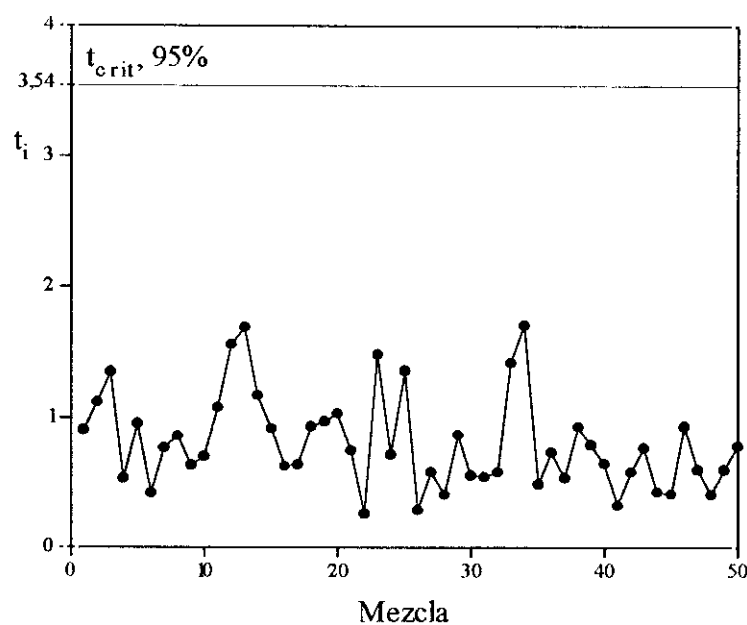


Fig. 54.- Residual externo de Student de cada mezcla de calibración para el método PCR.

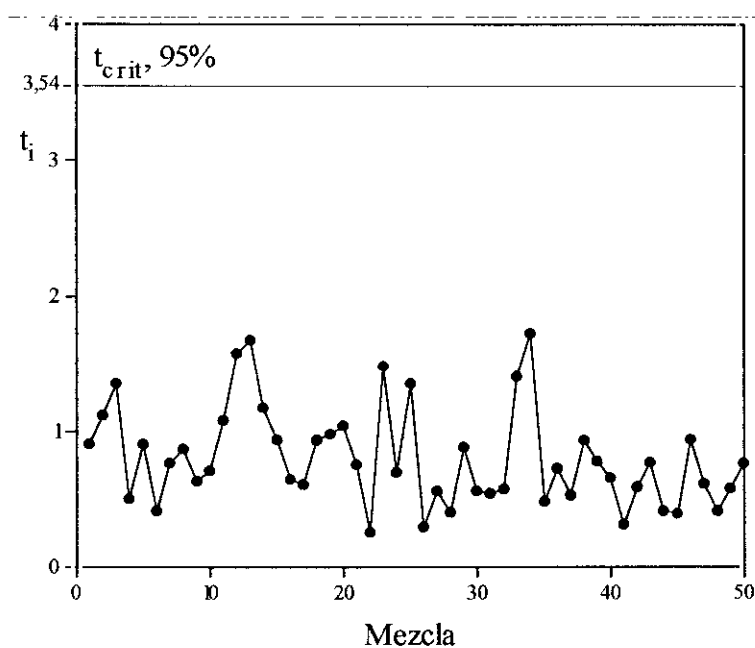


Fig. 55.- Residual de Student externo de cada mezcla de calibración para el método PLS.

Por último, también se estudio otro parámetro, denominado distancia de Cook (D_i) (376,385) que está relacionado con la influencia o importancia de las mezclas en la estimación del modelo de calibración. Esta distancia de Cook viene dada por la expresión:

$$D_i = \frac{r_i^2}{p} \left(\frac{h_i}{1-h_i} \right)$$

donde r_i es el residual interno de Student y h_i es el efecto leva, los cuales han sido definidos anteriormente. El valor de este parámetro se compara con una distribución F de Snedecor. Una forma de comprobar la influencia de cada mezcla, es representar el logaritmo natural de cada uno de los términos que forman parte de dicho parámetro, es decir, $\log(r_i^2)$ frente a $\log(h_i/p(1-h_i))$ (529). En las figuras 56 a 60 se muestran los resultados de cada mezcla para cada uno de los métodos de calibración así como el contorno de valores constantes de $\log(D_i)$ a un nivel de confianza del 10% el cual, que como ya se ha comentado anteriormente, está relacionado con la distribución F de Snedecor. Como puede observarse, para todos los métodos, los valores de todas las mezclas se encuentran por debajo de dicho contorno o valor crítico, lo que significa que ninguna mezcla tiene una gran influencia en la estimación de los diferentes modelos de calibración multivariante. Al igual que en el caso de los residuales de Student, se observa una gran similitud entre los métodos PCR y PLS.

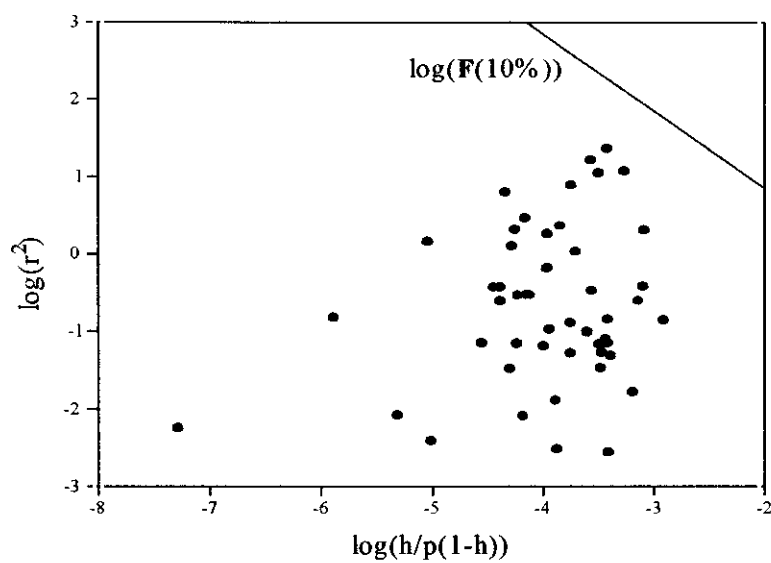


Fig. 56.- Distancia de Cook de cada mezcla de calibración para el método CLS.

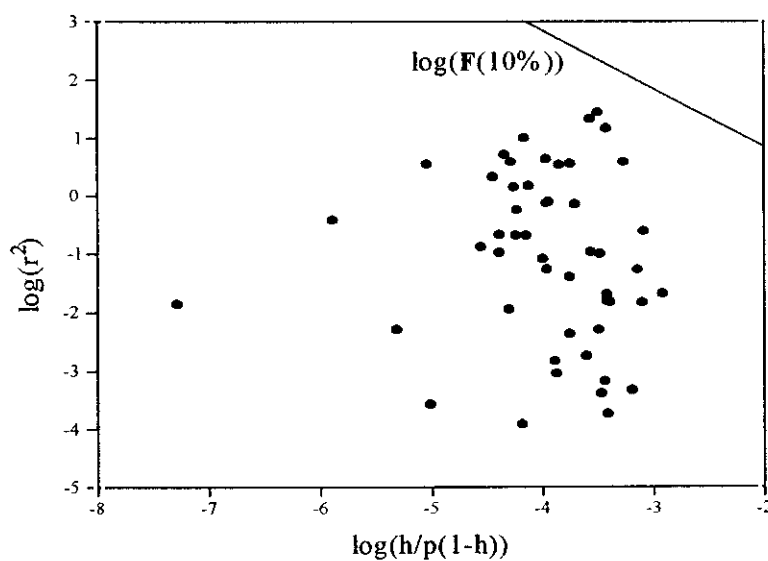


Fig. 57.- Distancia de Cook de cada mezcla de calibración para el método KF.

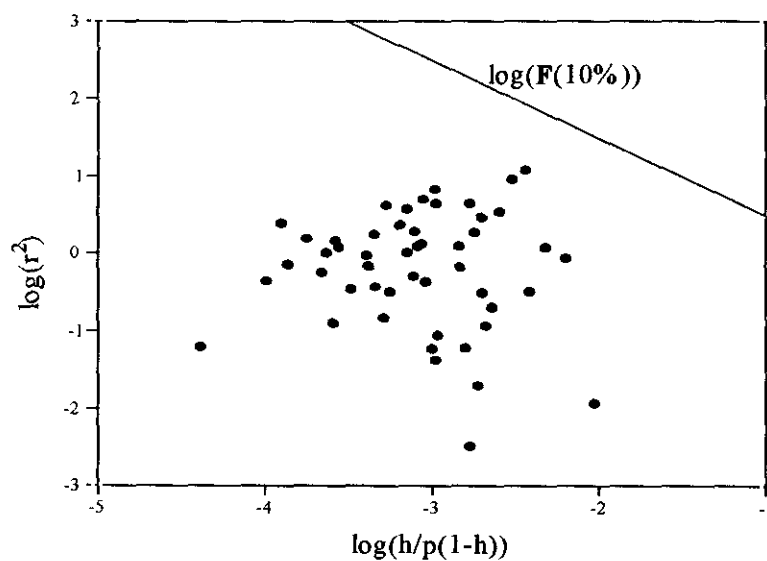


Fig. 58.- Distancia de Cook de cada mezcla de calibración para el método ILS.

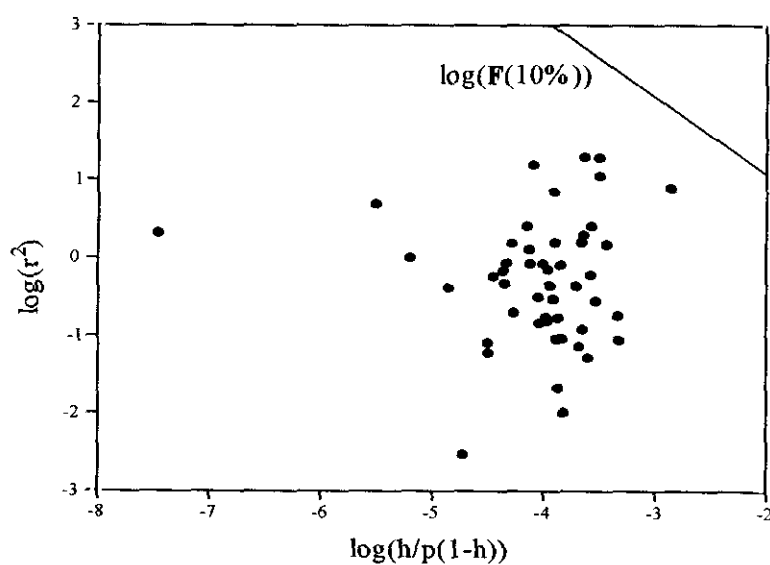


Fig. 59.- Distancia de Cook de cada mezcla de calibración para el método PCR.

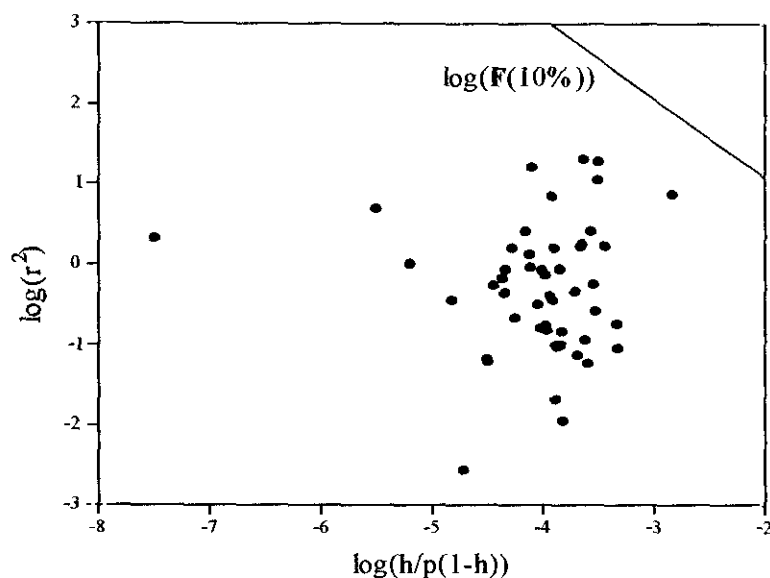


Fig. 60.- Distancia de Cook de cada mezcla de calibración para el método PLS.

Este estudio realizado para la detección de posibles mezclas de calibración que se encuentran fuera del intervalo muestral, ponen de manifiesto que, en este caso, el diseño aleatorio de 50 mezclas de calibración (tabla XXVIII) que se va a utilizar para el estudio comparativo de los métodos de calibración multivariante CLS, ILS, KF, PCR y PLS, es, desde el punto de vista estadístico, suficientemente representativo como para que las diferencias que se puedan apreciar en la etapa de validación sean consecuencia únicamente del método de calibración empleado.

D.2.3.d. Etapa de validación

La precisión y exactitud de cada uno de los cinco métodos de calibración multivariante estudiados (CLS, KF, ILS, PCR y PLS) ha sido evaluada a través de 36 mezclas de validación generadas aleatoriamente (tabla XXIX) y mediante el cálculo de los correspondientes valores de RPE, SEP y R^2 , de un modo similar al seguido en el método manual (capítulo D.1).

Antes de esta comparación global entre métodos, se procedió a estudiar la concordancia existente entre la concentración real y la estimada para cada clorofenol y cada método de calibración. Los resultados se muestran en las figuras 61 a 65. Como puede apreciarse el 2-clorofenol no muestra diferencias significativas ($\alpha=0.05$) ni en la pendiente ni en la ordenada en el origen, para ninguno de los métodos de calibración estudiados. El 2,4-diclorofenol presenta diferencias significativas cuando la estimación de la concentración se hace a partir de los métodos de calibración multivariante CLS y KF, y el 4-cloro-3-metilfenol presenta diferencias significativas para el KF y en la ordenada en el origen para el CLS. El 2,4,6-triclorofenol presenta diferencias significativas para todos los métodos, pero solamente en la ordenada en el origen, no así en la pendiente, lo que indica que las diferencias vienen dadas por errores puntuales de algunas de las estimaciones. Finalmente, el pentaclorofenol muestra diferencias significativas en cuanto a la pendiente, para todos los métodos estudiados, lo que indica que la estimación de este clorofenol está sometido a algún tipo de error sistemático. Como sea que el estudio realizado en D.1.3.b., relativo a la validación del método multivariante CLS de forma manual, no se encontraron diferencias significativas ni en la ordenada en el origen, ni en la pendiente, y en ese estudio no se incluía el 2,4,6-triclorofenol, puede suponerse que el error sistemático ahora, tenga relación con la presencia/ausencia de este fenol, ya que ambos fenoles presentan espectros muy parecidos. Para comprobar esta

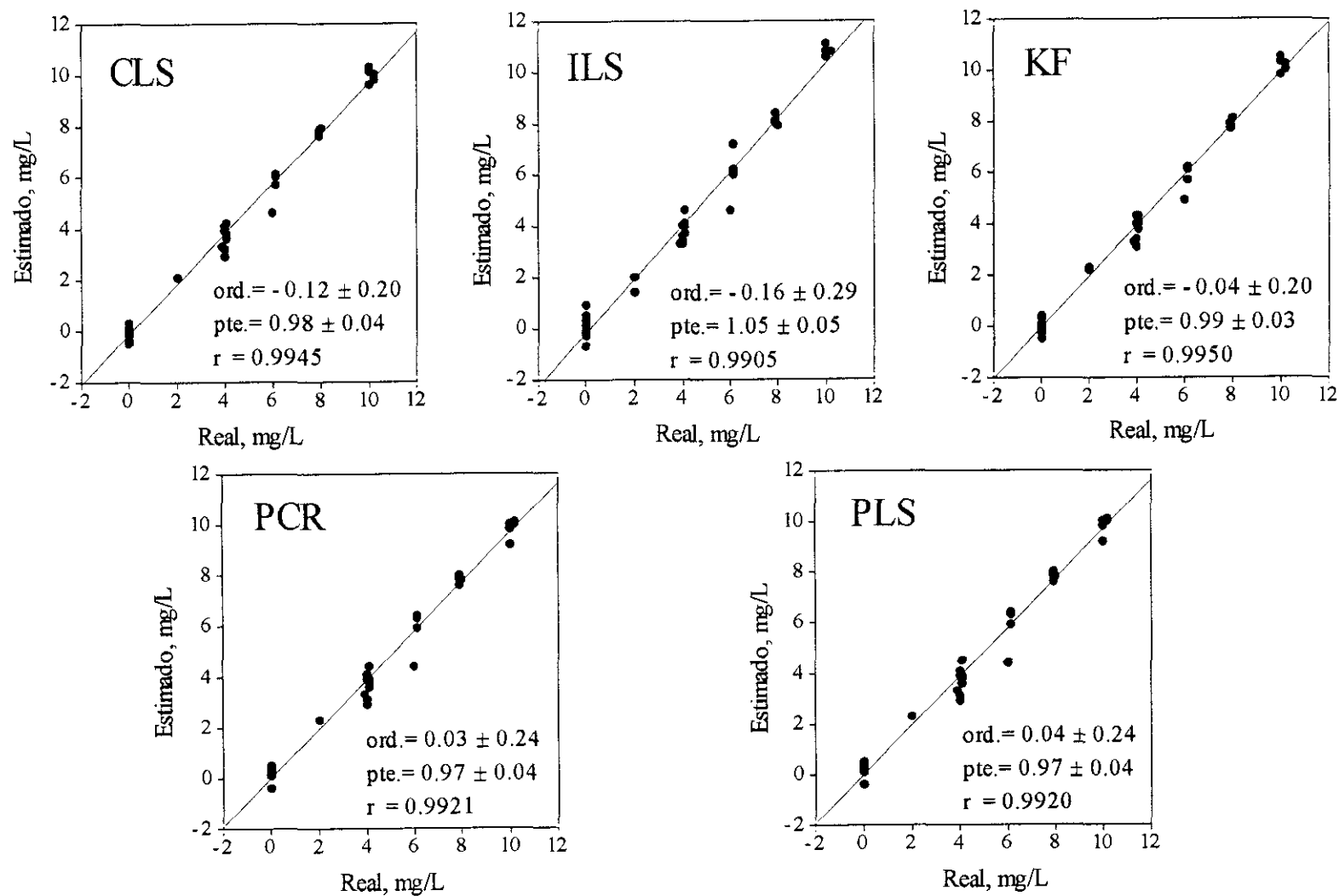


Fig. 61.- Correlación entre la concentración real y la concentración estimada para el 2-clorofenol. ($\alpha = 0.05$)

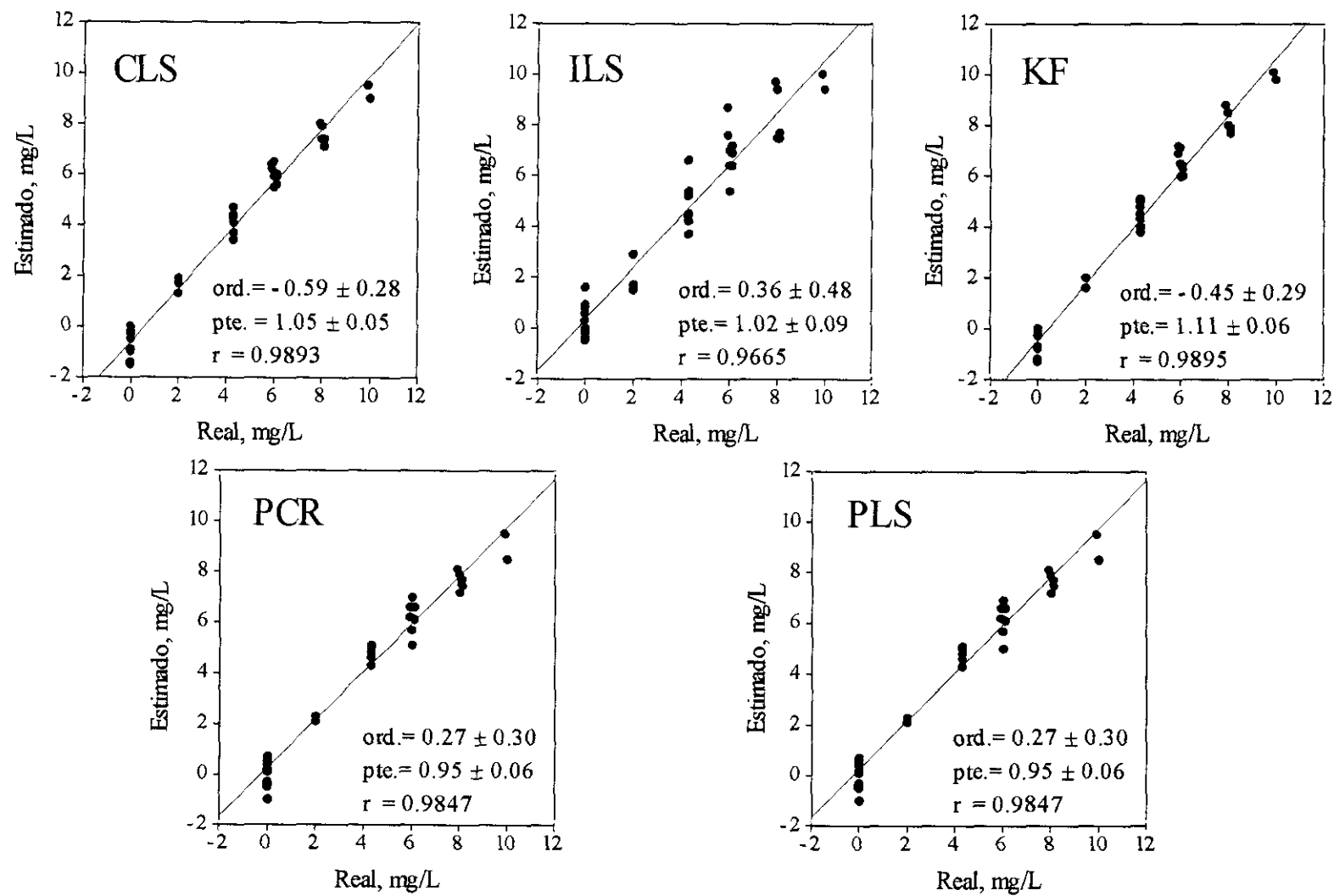


Fig. 62.- Correlación entre la concentración real y la concentración estimada para el 4-cloro-3-metilfenol. ($\alpha = 0.05$)

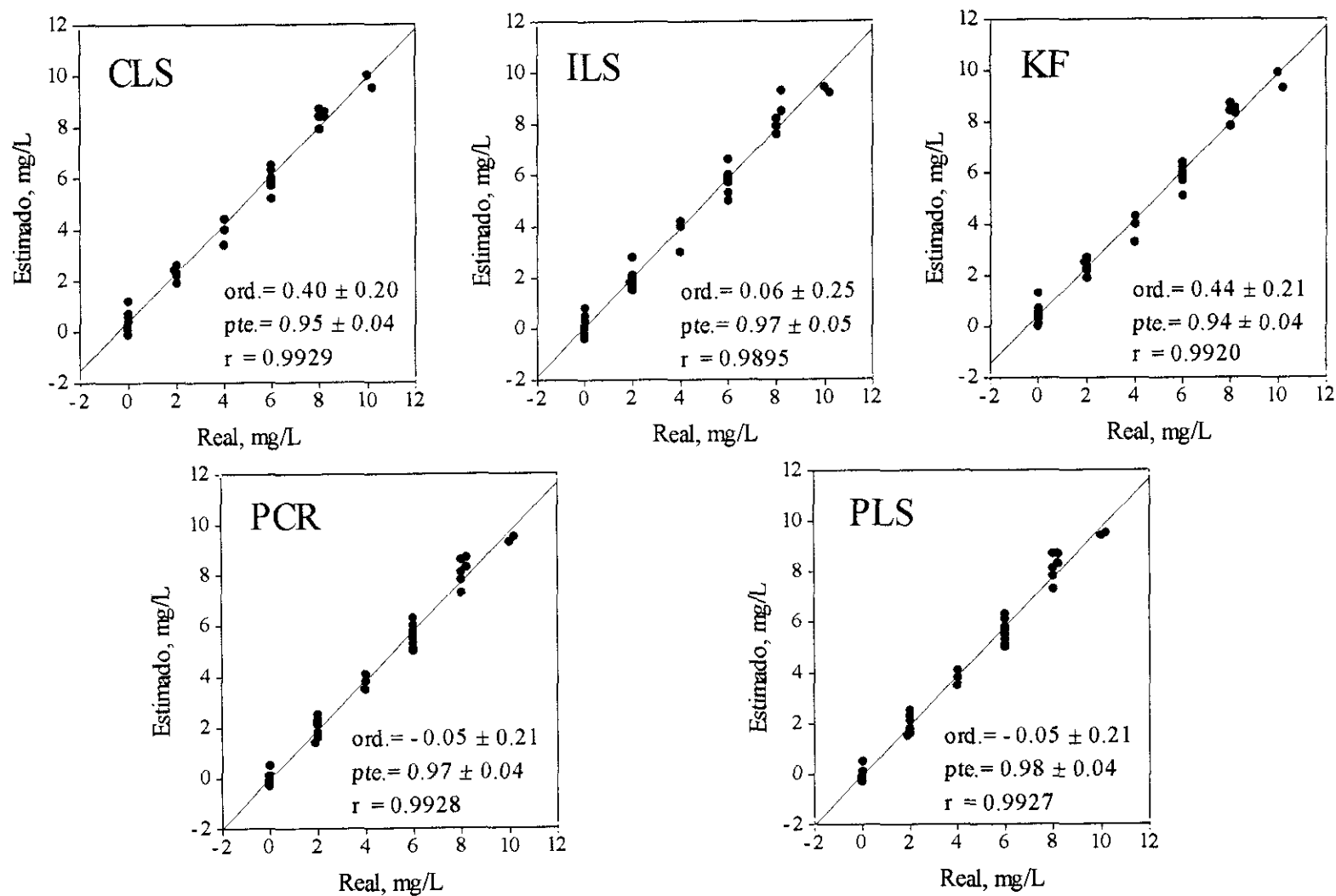


Fig. 63.- Correlación entre la concentración real y la concentración estimada para el **2,4-diclorofenol**. ($\alpha = 0.05$)

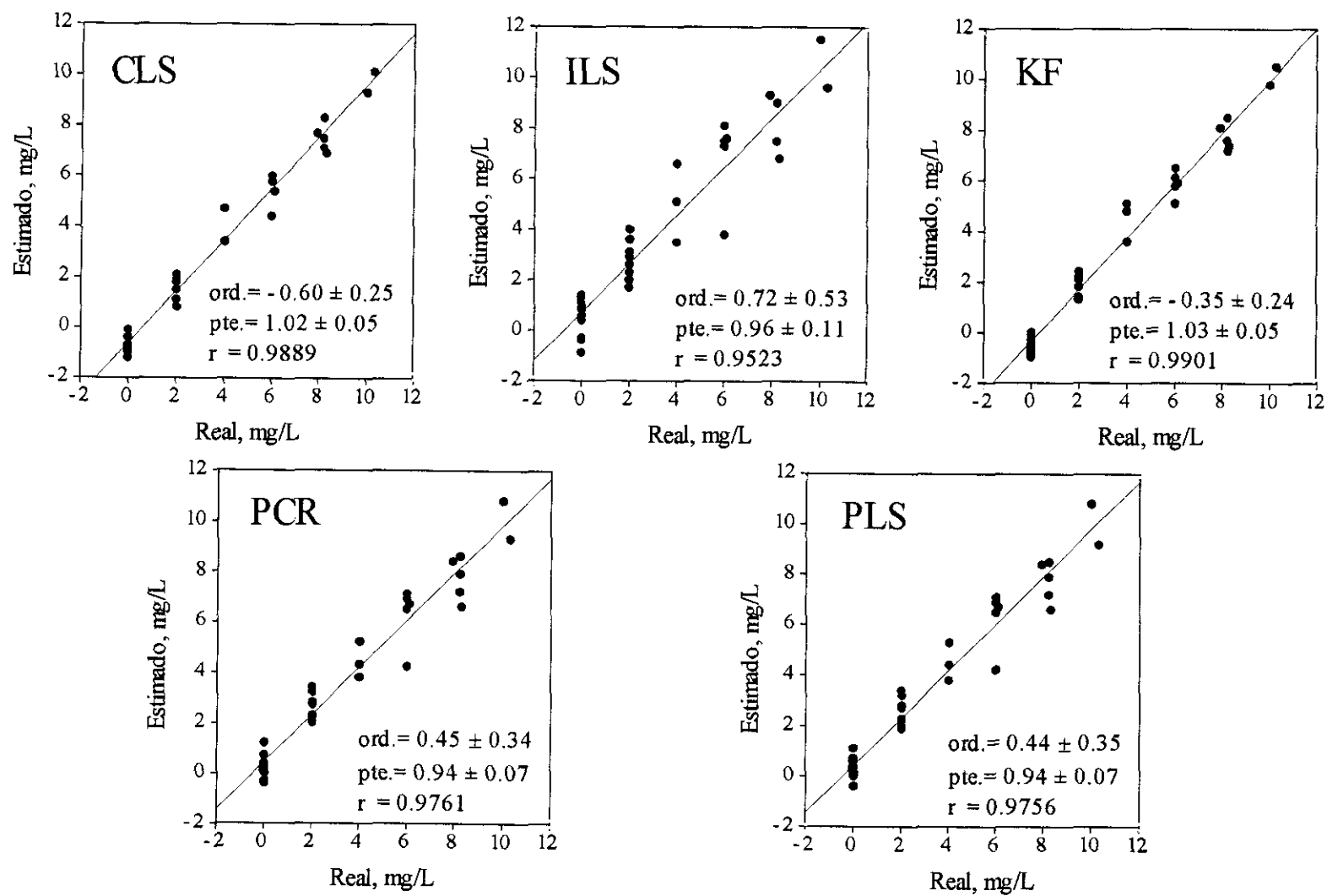


Fig. 64.- Correlación entre la concentración real y la concentración estimada para el 2,4,6-triclorofenol. ($\alpha = 0.05$)

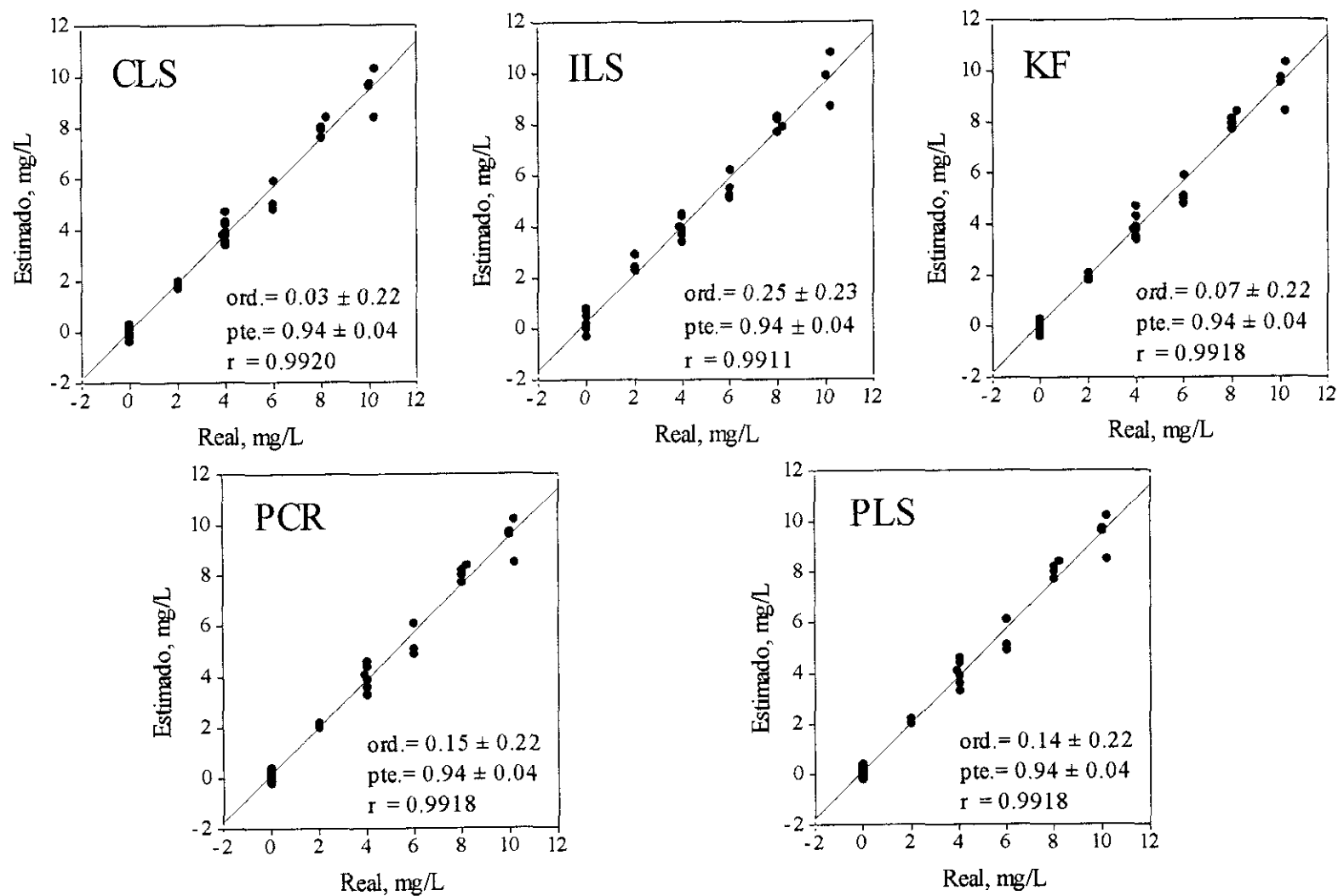


Fig. 65.- Correlación entre la concentración real y la concentración estimada para el **Pentaclorofenol**. ($\alpha = 0.05$)

posibilidad, se estudió por separado la correlación existente entre la concentración real y la estimada de pentaclorofenol en aquellas mezclas de validación que no contenían 2,4,6-triclorofenol y las que sí contenían este fenol. La figura 66 muestra en rojo las rectas ajustadas considerando solamente aquellas mezclas que no contienen 2,4,6-triclorofenol, y en negro todas las demás. Como puede apreciarse, salvo el ILS, ahora no se encuentran diferencias significativas ni en la ordenada en el origen ni en la pendiente cuando en el cálculo de estas no se incluyen las mezclas en las que el 2,4,6-triclorofenol se encuentra ausente; por lo que podría concluirse que el error sistemático en la estimación del pentaclorofenol está en relación con el empleo de mezclas en las que el 2,4,6-triclorofenol se encuentra ausente.

En cuanto a la comparación global de los diferentes métodos de calibración multivariante aplicados en FIA, en las tablas XXX, XXXI, XXXII se muestran los valores de RPE, SEP y R^2 de cada clorofenol para cada método de calibración.

TABLA XXX. RPE(%) de cada clorofenol y MRPE(%) para cada método de calibración.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	7.3	6.4	9.7	8.2	8.2
4-cloro-3-metilfenol	13	12	19	11	11
2,4-diclorofenol	9.2	9.4	9.5	8.5	8.5
2,4,6-triclorofenol	16	12	25	16	16
Pentaclorofenol	9.8	9.6	9.9	9.5	9.5
MRPE	11	10	15	10	10

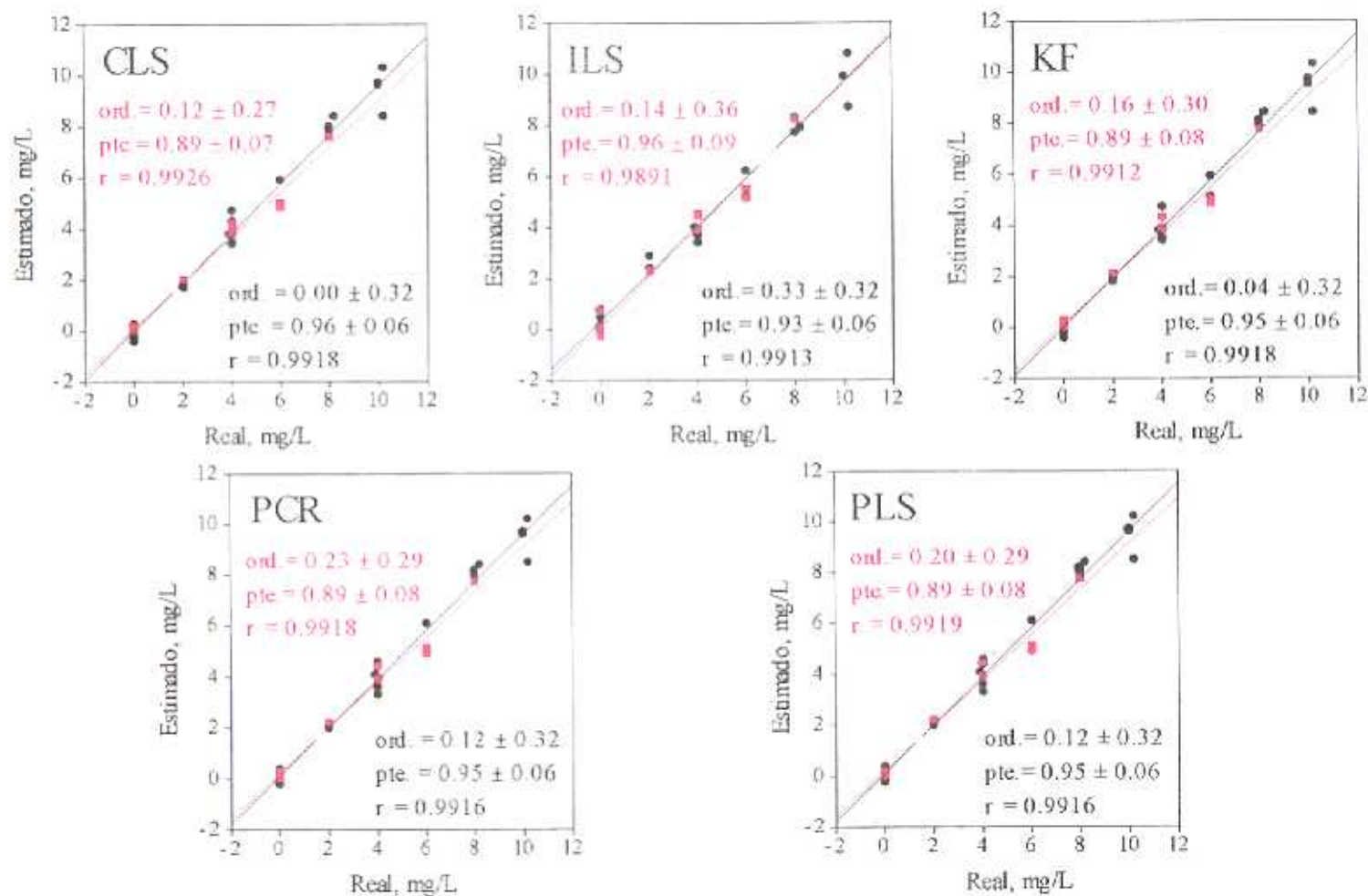


Fig. 66.- Influencia de la ausencia/presencia de 2,4,6-triclorofenol en la determinación de pentaclorofenol. ($\alpha = 0.05$)

- Rojo: Regresión lineal correspondiente a las mezclas en las que el 2,4,6-triclorofenol se encuentra ausente.
- Negro: Regresión lineal correspondiente a las mezclas en las que el 2,4,6-triclorofenol se encuentra presente.

TABLA XXXI. SEP (mg/L) de cada clorofenol y SEPT (mg/L) para cada método de calibración.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	0.41	0.37	0.55	0.47	0.47
4-cloro-3-metilfenol	0.66	0.63	0.99	0.57	0.57
2,4-diclorofenol	0.47	0.48	0.49	0.44	0.44
2,4,6-triclorofenol	0.74	0.57	1.2	0.76	0.77
Pentaclorofenol	0.50	0.50	0.51	0.49	0.49
SEPT	0.57	0.52	0.80	0.56	0.56

TABLA XXXII. R² de cada clorofenol para cada método de calibración.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	0.978	0.998	0.885	0.940	0.940
4-cloro-3-metilfenol	0.878	0.798	0.882	0.926	0.926
2,4-diclorofenol	0.925	0.902	0.961	0.966	0.969
2,4,6-triclorofenol	0.921	0.918	0.965	0.923	0.921
Pentaclorofenol	0.907	0.904	0.905	0.893	0.896

A partir de estas tablas se observa que el KF es el que presenta, en general, un valor más bajo del RPE para cada clorofenol, mientras que a nivel global (MRPE) tanto el KF como el PCR y PLS muestran el mismo valor. Por otra parte, el ILS presenta los peores resultados, tanto a nivel individual como global, y el PCR y el PLS dan lugar a resultados similares tanto para el RPE como para el SEP y el R^2 . En cuanto a nivel individual, el pentaclorofenol tiene valores de RPE prácticamente similares en todos los métodos, el 2,4,6-triclorofenol es el que presenta los peores resultados con todos los métodos ($RPE \geq 12\%$), mientras que el 2-clorofenol, el 4-cloro-3-metilfenol y el 2,4-diclorofenol presentan errores dispares, dependiendo del método utilizado.

En cuanto al valor del SEP, la comparación de varianzas (SEP^2) muestra que únicamente el ILS presenta diferencias significativas al 95%, a nivel global (SEPT) con todos los demás métodos, cuando se comparan entre sí (tabla XXXIII). A nivel individual, el 2-clorofenol muestra diferencias significativas entre el ILS con el CLS y KF; el 4-cloro-3-metilfenol muestra diferencias significativas entre el ILS con todos los demás métodos y el 2,4,6-triclorofenol muestra diferencias significativas entre el ILS con todos los demás métodos y entre el KF con el PCR y PLS. El 2,4-diclorofenol y el pentaclorofenol no muestran diferencias significativas al 95% entre ninguno de los métodos de calibración.

Por último, en cuanto al R^2 únicamente el 4-cloro-3-metilfenol utilizando el método KF presenta una baja correlación ($R=0.893$), mientras que los demás clorofenoles presentan una correlación aceptable con todos los métodos ($R>0.9$).

TABLA XXXIII. F calculado para cada clorofenol. Comparación entre los diferentes métodos de calibración multivariante.

	F_{cal}									
	CLS/ILS	CLS/KF	CLS/PCR	CLS/PLS	ILS/KF	ILS/PCR	ILS/PLS	KF/PCR	KF/PLS	PCR/PLS
2CF	1.8	1.2	1.3	1.3	2.2	1.4	1.4	1.6	1.6	1.0
4C3MF	2.3	1.1	1.3	1.3	2.5	3.0	3.0	1.2	1.2	1.0
DCF	1.1	1.0	1.1	1.1	1.0	1.2	1.2	1.2	1.2	1.0
TCF	2.6	1.7	1.1	1.1	4.4	2.5	2.4	1.8	1.8	1.0
PCF	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0
Total	2.0	1.2	1.0	1.0	2.4	2.0	2.0	1.2	1.2	1.0

F_{crit.}(95%) = 1.74

A la vista de los resultados podemos concluir que tanto el PCR como el PLS son los métodos que presentan, en general, los mejores resultados para la determinación conjunta de cada uno de los clorofenoles, con un menor error de predicción y una mayor correlación, seguidos por el CLS. El ILS es el método que muestra los peores resultados, presentando los mayores errores relativos de predicción, tanto a nivel individual para cada clorofenol (RPE), como a nivel global (MRPE). Esta misma tendencia se observa cuando la comparación entre métodos se hace por medio del error estándar de predicción tanto a nivel individual (SEP), como a nivel global (SEPT).

D.2.4. Determinación multivariante de clorofenoles en diferentes tipos de aguas

Con vistas a evaluar la aplicabilidad de los métodos multivariantes en la determinación extractivo-espectrofotométrica de los clorofenoles contaminantes prioritarios, 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol, se procedió a la determinación de estos compuestos en diferentes tipos de aguas, que tras comprobar que se encontraban libres de fenoles, al menos en cantidades detectables por el procedimiento propuesto, se las añadió entre 0-200 µg/L de cada uno de los clorofenoles, para así, simular en la medida de lo posible las cantidades que pueden llegar a encontrarse en este tipo de muestras, y que, de acuerdo con la regulación de la Unión Europea relativas a la calidad requerida para las aguas superficiales destinada a producción de agua potable, no puede ser superior a 0.1 mg/L (292), y en lo relativo a la calidad de las aguas destinadas a baño, el límite se encuentra en 0.05 mg/L (293).

Puesto que las concentraciones a las que los clorofenoles se encuentran en este tipo de muestras es muy inferior a las que los métodos multivariantes propuestos aquí pueden ser aplicados, el proceso analítico de determinación requiere un paso previo de preconcentración mediante el empleo de una resina polimérica XAD-4, adsorbente habitualmente utilizado en la preconcentración de fenoles y con el que se obtienen recuperaciones próximas al 100%. El proceso de preparación de la resina, así como el procedimiento de preconcentración y elución de los fenoles se encuentran descritos en el apartado C.4.2.b. Como matriz de calibración para la aplicación de los diferentes métodos multivariantes, se ha empleado la misma que se utilizó en el estudio previo de determinación de clorofenoles mediante calibración multivariante en FIA y espectrofotometría derivada (apartado D.2.3.).

D.2.4.a. Agua purificada (Milli Q)

Con el fin de evaluar los posibles efectos de matriz que los diferentes componentes del agua pueden tener sobre el resultado final del análisis; así como para comprobar la eficacia del proceso de preconcentración y elución, se hizo previamente un estudio de la recuperación de los distintos clorofenoles en agua purificada mediante un aparato de Milli Q. Se analizaron, siguiendo el procedimiento de preconcentración y determinación en FIA descrito en C.4.2.b., 10 mezclas de agua purificada mediante un aparato Milli Q y que contenían entre 0-200 $\mu\text{g/L}$ de cada clorofenol estudiado. La determinación de los clorofenoles se hizo de forma conjunta aplicando los cinco métodos de calibración multivariante estudiados.

Los resultados obtenidos para cada uno de las 10 muestras se presentan en la tabla XXXIV, donde se aprecia la capacidad predictiva de los diferentes métodos estudiados, incluido los casos en que había ausencia de algún clorofenol. La recuperación media así como los valores de RPE y SEP se muestran en las tablas XXXV, XXXVI, XXXVII. A la vista de estos resultados se observa que la recuperación media se encuentra alrededor del 100% para todos los clorofenoles y métodos de calibración estudiados. Sin embargo, en cuanto a los valores de RPE y SEP, el método CLS es el que presenta, en general, los mejores resultados ($\text{RPE} \leq 7.2\%$ y $\text{SEP} \leq 7 \mu\text{g/L}$), siendo, por el contrario, el método ILS el que presenta, como en los casos anteriores, los resultados más inexactos e imprecisos, mientras que el PCR y PLS muestran resultados similares, confirmando prácticamente los resultados obtenidos en la validación de cada uno de los métodos de calibración.

TABLA XXXIV. Determinación multivariante de clorofenoles en agua Milli Q.

Muestra		CLS		KF		ILS		PCR		PLS	
	P	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec
2CF	120	116	96.7	120	100	138	115	114	95.0	114	95.0
4C3MF	120	115	95.8	127	106	127	106	114	95.0	114	95.0
DCF	100	102	102	101	101	104	104	97	97.0	98	98.0
TCF	140	139	99.3	148	106	139	99.3	144	103	143	102
PCF	120	118	98.3	119	99.2	109	90.8	119	99.2	119	99.2
2CF	140	134	95.7	138	98.6	131	93.6	136	97.1	136	97.1
4C3MF	100	97	97.0	108	108	92	92.0	100	100	100	100
DCF	60	55	91.7	56	93.3	56	93.3	56	93.3	56	93.3
TCF	80	74	92.5	80	100	74	92.5	75	93.8	74	92.5
PCF	100	94	94.0	94	94.0	88	88.0	93	93.0	92	92.0
2CF	120	125	104	128	107	124	103	126	105	126	105
4C3MF	80	77	96.3	87	109	93	116	79	98.8	79	98.8
DCF	140	144	103	143	102	143	102	145	104	145	104
TCF	60	61	102	68	113	57	95.0	61	102	60	100
PCF	60	60	100	60	100	52	86.7	59	98.3	59	98.3
2CF	100	95	95.0	99	99.0	85	85.0	99	99.0	98	98.0
4C3MF	140	143	102	155	111	134	95.7	136	97.1	136	97.1
DCF	100	94	94.0	93	93.0	113	113	110	110	110	110
TCF	80	88	110	97	121	76	95.0	60	75.0	60	75.0
PCF	40	39	97.5	40	100	44	110	33	82.5	32	80.0
2CF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
4C3MF	140	136	97.1	145	104	141	101	131	93.6	131	93.6
DCF	100	96	96.0	94	94.0	108	108	103	103	104	104
TCF	140	141	101	150	107	136	97.1	126	90.0	125	89.3
PCF	120	117	97.5	118	98.3	120	100	114	95.0	113	94.2
2CF	100	97	97.0	99	99.0	104	104	103	103	103	103
4C3MF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
DCF	60	61	102	61	102	65	108	64	107	64	107
TCF	80	79	98.8	82	103	82	103	80	100	79	98.8
PCF	60	58	96.7	58	96.7	51	85.0	56	93.3	55	91.7

TABLA XXXIV. (cont.)

Muestra		CLS		KF		ILS		PCR		PLS	
	P	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec
2CF	120	117	97.5	121	101	133	111	116	96.7	117	97.5
4C3MF	100	99	99.0	110	110	107	107	105	105	105	105
DCF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
TCF	100	111	111	117	117	134	134	123	123	122	122
PCF	140	137	97.9	138	98.6	142	101	138	98.6	138	98.6
2CF	140	146	104	150	107	152	109	147	105	147	105
4C3MF	80	83	104	94	118	97	121	90	113	90	113
DCF	140	142	101	141	101	141	101	135	96.4	135	96.4
TCF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
PCF	100	99	99.0	100	100	108	108	102	102	102	102
2CF	160	158	98.8	163	104	166	104	158	98.8	158	98.8
4C3MF	160	154	96.3	170	106	148	92.5	140	87.5	140	87.5
DCF	200	198	99.0	198	99.0	215	108	214	107	215	108
TCF	120	130	108	142	118	95	79.2	99	82.5	98	81.7
PCF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
2CF	100	112	112	117	117	126	126	108	108	108	108
4C3MF	180	177	98.3	192	107	173	96.1	167	92.8	166	92.2
DCF	120	119	99.2	118	98.3	125	104	121	101	121	101
TCF	140	143	102	155	111	151	108	135	96.4	134	95.7
PCF	140	146	104	147	105	148	106	145	104	145	104

P: Puesto ($\mu\text{g/L}$)E: Estimado ($\mu\text{g/L}$)

Rec: Recuperación (%)

• valores por debajo del límite de detección ($\text{L.D.} = t(99\%).\text{SEP}$)

TABLA XXXV. Recuperación media (%) de cada clorofenol para cada método de calibración en agua Milli Q.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	100	104	106	101	101
4-cloro-3-metilfenol	98.4	109	103	98.1	98.0
2,4-diclorofenol	98.7	98.2	105	102	102
2,4,6-triclorofenol	103	111	100	96.2	95.2
Pentaclorofenol	98.3	99.1	97.3	96.2	95.6

TABLA XXXVI. RPE(%) de cada clorofenol y MRPE(%) para cada método de calibración en agua Milli Q.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	5.1	6.1	12	4.5	4.5
4-cloro-3-metilfenol	2.8	8.2	7.6	8.0	8.1
2,4-diclorofenol	3.3	3.6	7.0	5.6	5.8
2,4,6-triclorofenol	7.2	12	14	12	13
Pentaclorofenol	4.9	5.0	7.6	5.1	5.2
MRPE	4.5	6.8	9.3	7.0	7.1

TABLA XXXVII. SEP ($\mu\text{g/L}$) de cada clorofenol y SEPT ($\mu\text{g/L}$) para cada método de calibración en agua de Milli Q.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	6	7	14	5	5
4-cloro-3-metilfenol	3	10	9	10	10
2,4-diclorofenol	4	4	8	6	7
2,4,6-triclorofenol	7	13	14	13	13
Pentaclorofenol	5	5	7	5	5
SEPT	5	8	11	8	8

En cuanto a la comparación estadística entre el CLS y los demás métodos, el criterio F aplicado a los valores de SEP para un nivel de confianza del 95%, muestra que existen diferencias significativas solamente entre el ILS y el CLS a nivel global (SEPT) (tabla XXXVIII). A nivel individual se ha encontrado que el CLS es significativamente mejor que los demás métodos multivariantes para la determinación del 4-cloro-3-metilfenol y el 2,4,6-triclorofenol.

TABLA XXXVIII. F calculado para cada clorofenol. Comparación entre el CLS y los demás métodos de calibración multivariante en la determinación de clorofenoles en agua Milli Q.

	F_{cal}			
	CLS/ILS	CLS/KF	CLS/PCR	CLS/PLS
2CF	5.4	1.4	1.4	1.4
4C3MF	9.0	11	11	11
DCF	4.0	1.0	2.3	2.3
TCF	4.0	3.4	3.4	3.4
PCF	2.0	1.0	1.0	1.0
Total	4.8	2.6	2.6	2.6

$F_{crit.}(95\%) = 2.98$

D.2.4.b. Agua de consumo público

A continuación, se estudió la determinación de los clorofenoles 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol en 9 muestras de agua de consumo público obtenidas en el propio laboratorio a las que se les añadió, como en el caso anterior, entre 0-200 µg/L de dichos clorofenoles. El resultado de las determinaciones se muestra en la tabla XXXIX a nivel individual y la recuperación media así como los valores de RPE y SEP se muestran en las tablas XL, XLI, XLII. A la vista de estos resultados se observa que la recuperación media se encuentra, como en el caso anterior, alrededor del 100% para todos los clorofenoles y métodos de calibración estudiados excepto

TABLA XXXIX. Determinación multivariante de clorofenoles en agua de consumo público.

Muestra		CLS		KF		ILS		PCR		PLS	
	P	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec
2CF	140	138	98.6	143	102	134	95.7	138	98.6	138	98.6
4C3MF	120	122	102	135	113	113	94.2	116	96.7	116	96.7
DCF	120	128	107	128	107	125	104	135	113	135	113
TCF	100	103	103	112	112	94	94.0	91	91.0	90	90.0
PCF	100	106	106	107	107	105	105	104	104	103	103
2CF	100	96	96.0	99	99.0	82	82.0	98	98.0	98	98.0
4C3MF	80	77	96.3	86	108	62	77.5	73	91.3	73	91.3
DCF	140	139	99.3	138	98.6	138	98.6	150	107	150	107
TCF	120	122	102	129	108	89	74.2	104	86.7	103	86.7
PCF	80	76	95.0	77	96.3	71	88.8	72	90.0	72	90.0
2CF	160	158	98.8	163	102	140	87.5	160	100	160	100
4C3MF	100	95	95.0	107	107	92	92.0	98	98.0	98	98.0
DCF	100	106	106	105	105	100	100	107	107	107	107
TCF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
PCF	140	140	100	141	101	159	114	139	99.3	139	99.3
2CF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
4C3MF	160	167	104	178	111	151	94.4	155	96.9	155	96.9
DCF	160	162	101	159	99.4	163	102	168	105	169	106
TCF	140	159	114	171	122	137	97.9	143	102	141	101
PCF	140	148	106	149	106	139	99.3	145	104	145	104
2CF	60	63	105	64	107	64	107	67	112	67	112
4C3MF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
DCF	120	123	103	121	101	122	102	127	106	128	107
TCF	80	94	118	99	124	80	100	89	111	88	110
PCF	120	124	103	124	103	119	99.2	121	101	121	101
2CF	180	188	104	192	107	189	105	190	106	190	106
4C3MF	60	56	93.3	67	112	51	85.0	60	100	59	98.3
DCF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
TCF	160	171	107	174	109	157	98.1	165	103	164	102
PCF	60	66	110	67	112	63	105	64	107	64	107

TABLA XXXIX. (cont.)

Muestra		CLS		KF		ILS		PCR		PLS	
	P	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec
2CF	160	151	94.4	156	97.5	135	84.4	153	95.6	153	95.6
4C3MF	180	167	92.8	182	101	158	87.8	165	91.7	165	91.7
DCF	60	57	95.0	59	98.3	49	81.7	64	107	64	107
TCF	60	57	95.0	65	108	•	—	•	—	•	—
PCF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
2CF	140	134	95.7	138	98.6	128	91.4	133	95.0	134	95.7
4C3MF	140	134	95.7	148	106	114	81.4	128	91.4	128	91.4
DCF	80	75	93.8	75	93.8	75	93.8	82	103	83	104
TCF	120	118	98.3	127	106	116	96.7	104	86.7	103	85.8
PCF	120	127	106	127	106	129	108	123	103	123	103
2CF	200	194	97.0	200	100	181	90.5	193	96.5	193	96.5
4C3MF	180	177	98.3	195	108	157	87.2	162	90.0	162	90.0
DCF	140	145	104	146	104	144	103	161	115	162	116
TCF	140	133	95.0	145	104	87	62.1	102	72.9	100	71.4
PCF	60	57	95.0	58	96.7	47	78.3	53	88.3	52	86.7

P: Puesto ($\mu\text{g/L}$)E: Estimado ($\mu\text{g/L}$)

Rec: Recuperación (%)

• valores por debajo del límite de detección (L.D. = $t(99\%).\text{SEP}$)

TABLA XL. Recuperación media (%) de cada clorofenol para cada método de calibración en agua de consumo público.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	98.7	102	92.9	100	100
4-cloro-3-metilfenol	97.2	108	87.4	94.5	94.3
2,4-diclorofenol	101	101	98.1	108	108
2,4,6-triclorofenol	104	112	89.0	91.3	90.5
Pentaclorofenol	103	104	99.7	99.6	99.3

TABLA XLI. RPE(%) de cada clorofenol y MRPE(%) para cada método de calibración en agua de consumo público.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	3.8	3.4	11	4.2	4.2
4-cloro-3-metilfenol	4.7	8.4	13	7.6	7.8
2,4-diclorofenol	4.1	3.7	5.3	9.1	9.4
2,4,6-triclorofenol	8.4	13	20	14	15
Pentaclorofenol	4.9	5.3	8.9	4.7	4.8
MRPE	5.2	6.8	10	7.4	7.6

TABLA XLII. SEP ($\mu\text{g/L}$) de cada clorofenol y SEPT ($\mu\text{g/L}$) para cada método de calibración en agua de consumo público.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	5	5	15	6	6
4-cloro-3-metilfenol	6	11	16	10	10
2,4-diclorofenol	5	4	6	10	11
2,4,6-triclorofenol	9	14	22	17	17
Pentaclorofenol	5	5	9	5	5
SEPT	6	9	15	10	10

para el 4-cloro-3-metilfenol y el 2,4,6-triclorofenol en el caso del ILS cuya recuperación, en ambos casos, es inferior al 90%. En cuanto a los valores de RPE y SEP, los resultados más exactos y precisos se obtienen, al igual que en el agua Milli Q, con el método CLS ($\text{RPE} \leq 8.4\%$ y $\text{SEP} \leq 9 \mu\text{g/L}$), siendo igualmente el ILS el que presenta, en general, los peores resultados, mientras que el PCR y el PLS muestran resultados muy similares entre sí.

En cuanto a la comparación estadística global (SEPT) de los métodos de calibración multivariante, y al igual que en el agua Milli Q, únicamente el ILS muestra diferencias significativas con el CLS al nivel de confianza del 95%, mientras que a nivel individual, se han encontrado diferencias significativas entre el CLS y KF para el 4-cloro-3-metilfenol y entre el CLS y el PCR y el CLS y PLS para el 2,4,6-triclorofenol (tabla XLIII).

TABLA XLIII. F calculado para cada clorofenol. Comparación entre el CLS y los demás métodos de calibración multivariante en la determinación de clorofenoles en agua de consumo público.

	F_{cal}			
	CLS/ILS	CLS/KF	CLS/PCR	CLS/PLS
2CF	9.0	1.0	1.4	1.4
4C3MF	7.1	3.4	2.8	2.8
DCF	1.4	1.6	2.8	2.3
TCF	6.0	2.4	3.6	3.6
PCF	3.2	1.0	1.0	1.0
Total	6.3	2.3	2.8	2.8

$F_{crit.}(95\%) = 3.18$

D.2.4.c. Agua de río

Se ha estudiado la determinación de los clorofenoles contaminantes prioritarios en muestras de agua de río. Tras comprobar, siguiendo el método FIA propuesto, que las muestras no contenían fenoles, al menos en cantidades detectables, se añadieron estos en concentraciones comprendidas entre 0-200 µg/L. Seguidamente se determinó el contenido de cada clorofenol siguiendo el mismo procedimiento que en casos anteriores. Los resultados obtenidos para 9 muestras se dan en la tabla XLIV, y la recuperación media así como los valores de RPE y SEP en las tablas XLV, XLVI, XLVII. A la vista de estos resultados se observa que la recuperación media presenta una gran variabilidad dependiendo del

TABLA XLIV. Determinación multivariante de clorofenoles en agua de río

Muestra		CLS		KF		ILS		PCR		PLS	
	P	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec
2CF	100	105	105	109	109	87	87.0	102	102	102	102
4C3MF	120	101	84.2	112	93.3	100	83.3	104	86.7	104	86.7
DCF	140	152	109	150	107	128	91.4	140	100	140	100
TCF	100	75	75.0	84	84.0	79	79.0	94	94.0	94	94.0
PCF	140	131	93.6	132	94.3	138	98.6	135	96.4	136	97.1
2CF	160	152	95.0	156	97.5	154	96.3	152	95.0	152	95.0
4C3MF	80	57	71.3	67	83.8	79	98.8	71	88.8	71	88.8
DCF	100	114	114	114	114	94	94.0	97	97.0	97	97.0
TCF	40	•	—	•	—	32	80.0	47	118	47	118
PCF	60	50	83.3	50	83.3	48	80.0	56	93.3	56	93.3
2CF	80	78	97.5	81	101	92	115	73	91.3	73	91.3
4C3MF	160	142	88.8	154	96.3	145	90.6	140	87.5	140	87.5
DCF	180	189	105	187	104	175	97.2	176	97.8	177	98.3
TCF	140	117	83.6	129	92.1	130	92.9	134	95.7	133	95.0
PCF	100	96	96.0	97	97.0	102	102	101	101	101	101
2CF	200	195	97.5	201	101	203	102	189	94.5	189	94.5
4C3MF	200	182	91.0	200	100	205	103	181	90.5	181	90.5
DCF	160	160	100	161	101	150	93.8	147	91.9	147	91.9
TCF	60	•	—	48	80.0	60	100	54	90.0	53	88.3
PCF	40	31	77.5	32	80.0	56	140	37	92.5	37	92.5
2CF	40	30	75.0	31	77.5	42	105	30	75.0	31	77.5
4C3MF	60	•	—	52	86.7	59	98.3	57	95.0	57	95.0
DCF	80	89	111	87	109	74	92.5	79	98.8	79	98.8
TCF	120	94	78.3	99	82.5	114	95.0	113	94.2	113	94.2
PCF	160	146	91.3	146	91.3	148	92.5	148	92.5	148	92.5
2CF	120	122	102	125	104	98	81.7	120	100	120	100
4C3MF	100	73	73.0	83	83.0	93	93.0	88	88.0	88	88.0
DCF	140	148	106	147	105	119	85.0	125	89.3	125	89.3
TCF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
PCF	80	76	95.0	76	95.0	77	96.3	84	105	84	105

TABLA XLIV. (cont.)

Muestra		CLS		KF		ILS		PCR		PLS	
	P	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec
2CF	140	135	96.4	139	99.3	130	92.9	134	95.7	134	95.7
4C3MF	140	125	89.3	137	97.9	132	94.3	127	90.7	126	90.0
DCF	60	62	103	63	105	50	83.3	58	96.7	58	96.7
TCF	160	147	91.9	154	96.3	144	90.0	152	95.0	151	94.4
PCF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
2CF	140	132	94.3	136	97.1	128	91.4	132	94.3	132	94.3
4C3MF	100	82	82.0	93	93.0	87	87.0	91	91.0	91	91.0
DCF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
TCF	100	74	74.0	79	79.0	89	89.0	93	93.0	92	92.0
PCF	140	139	99.3	140	100	144	103	141	101	141	101
2CF	80	71	88.8	73	91.3	79	98.8	71	88.8	71	88.8
4C3MF	0	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
DCF	120	122	102	119	99.2	110	91.7	113	94.2	113	94.2
TCF	140	123	87.9	128	91.4	138	98.6	138	98.6	138	98.6
PCF	160	150	93.8	150	93.8	147	91.9	152	95.0	152	95.0

P: Puesto ($\mu\text{g/L}$)E: Estimado ($\mu\text{g/L}$)

Rec: Recuperación (%)

• valores por debajo del límite de detección (L.D. = $t(99\%) \cdot \text{SEP}$)

TABLA XLV. Recuperación media (%) de cada clorofenol para cada método de calibración en agua de río.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	94.6	97.5	96.7	93.0	93.2
4-cloro-3-metilfenol	82.8	91.8	93.5	89.8	89.7
2,4-diclorofenol	106	106	91.1	95.7	95.8
2,4,6-triclorofenol	81.8	86.5	90.6	97.3	96.8
Pentaclorofenol	91.2	91.8	101	97.1	97.2

TABLA XLVI. RPE(%) de cada clorofenol y MRPE(%) para cada método de calibración en agua de río.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	5.2	4.4	8.8	5.9	5.9
4-cloro-3-metilfenol	15	7.5	8.5	11	11
2,4-diclorofenol	8.1	7.8	8.6	6.4	6.3
2,4,6-triclorofenol	21	14	9.9	11	11
Pentaclorofenol	7.4	6.9	8.4	5.1	5.1
MRPE	13	8.5	8.7	8.0	8.1

TABLA XLVII. SEP ($\mu\text{g/L}$) de cada clorofenol y SEPT ($\mu\text{g/L}$) para cada método de calibración en agua de río.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	7	6	11	8	7
4-cloro-3-metilfenol	18	9	10	13	14
2,4-diclorofenol	10	9	10	8	8
2,4,6-triclorofenol	22	15	11	12	12
Pentaclorofenol	8	8	9	6	6
SEPT	14	10	10	10	10

clorofenol y del método de calibración empleado, obteniéndose, en general, recuperaciones medias próximas o superiores al 90% con excepción del 4-cloro-3-metilfenol cuando se determina mediante CLS, cuya recuperación media es del 82.8% y del 2,4,6-triclorofenol que da un 81.8% y 86.5% cuando la determinación se hace mediante CLS y KF respectivamente. En cuanto a los valores de RPE y SEP, los mejores resultados para cada clorofenol dependen del método de calibración. Así, mientras que el 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol presentan los mejores resultados empleando el PCR y PLS (RPE=6.4% y 5.1%), el 2,4,6-triclorofenol presenta los mejores resultados con el ILS (RPE=9.9%) y el 2-clorofenol y 4-cloro-3-metilfenol con el KF (RPE=4.4% y 7.5%, respectivamente). Por otra parte, y al contrario que las anteriores muestras de agua, el método CLS presenta, ahora, los resultados menos exactos y precisos. Este hecho puede ser debido a la presencia en estas muestras de pequeñas interferencias que influyan apreciablemente en la determinación de estos clorofenoles.

Considerando los resultados globales de cada método se observa que el PCR y PLS presentan los mejores resultados en cuanto a MRPE (8.0% y 8.1%, respectivamente), seguidos muy de cerca por el KF y ILS (8.5% y 8.7%, respectivamente). No obstante, a partir de los valores de SEPT no se observan diferencias significativas entre los cinco métodos de calibración multivariante (CLS, KF, ILS, PCR y PLS) (tabla XLVIII).

A nivel individual el 2-clorofenol presenta diferencias significativas al 95% cuando se comparan los resultados obtenidos con el KF y ILS; el 4-cloro-3-metilfenol los presenta cuando se compara el CLS con el KF y el CLS con el ILS; y para el 2,4,6-triclorofenol, todos los métodos, con excepción del KF, son significativamente mejores que el CLS. Finalmente, como se aprecia en la tabla XLVIII, el 2,4-diclorofenol y el pentaclorofenol no muestran ninguna diferencia significativa entre los distintos métodos de calibración.

A la vista de los resultados obtenidos para los diferentes tipos de aguas, se puede concluir que el método de calibración multivariante CLS es preciso y exacto cuando no existe efecto matriz debido a la presencia en la muestra de otras sustancias orgánicas (agua de Milli Q), o estas se encuentran en pequeña cuantía (agua de consumo público); pero es un método inadecuado cuando el contenido de materia orgánica interferente es mayor, como ocurre en las muestras de agua de río, debido a la presencia de ácidos húmicos y fúlvicos, sustancias estas con estructura de polifenoles. En este caso, los métodos bilineales de calibración multivariante (PCR y PLS), son los que han mostrado los resultados más precisos y exactos.

TABLA XLVIII. F calculada para cada clorofenol. Comparación entre los diferentes métodos de calibración multivariante en la determinación de clorofenoles en agua de río.

	F_{cal}									
	CLS/ILS	CLS/KF	CLS/PCR	CLS/PLS	ILS/KF	ILS/PCR	ILS/PLS	KF/PCR	KF/PLS	PCR/PLS
2CF	2.5	1.4	1.3	1.0	3.4	1.9	2.5	1.8	1.3	1.3
4C3MF	3.2	4.0	1.9	1.7	1.2	1.7	2.0	2.1	2.4	1.2
DCF	1.0	1.2	1.6	1.6	1.2	1.6	1.6	1.3	1.3	1.0
TCF	4.0	2.2	3.4	3.4	1.9	1.2	1.2	1.6	1.6	1.0
PCF	1.3	1.0	1.8	1.8	1.3	2.3	2.3	1.8	1.8	1.0
Total	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

$F_{crit.}(95\%) = 3.18$

D.2.5. Determinación multivariante de clorofenoles en muestras de orina humana

Los estudios realizados en el capítulo D.2.4., relativo a la determinación simultánea de los clorofenoles en muestras de agua, han puesto de manifiesto la importante influencia que sobre los resultados tiene la presencia de sustancias orgánicas en la matriz, y cómo métodos de calibración que conducen a resultados precisos y exactos en unas muestras, no son válidos para otras.

Con el fin de estudiar la aplicabilidad de estos métodos de calibración multivariante en muestras con alto contenido de materia orgánica, se planteó la posibilidad de determinar los clorofenoles contaminantes prioritarios 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol en muestras de orina. Estos compuestos pueden encontrarse en la orina en diferentes concentraciones, dependiendo del grado de exposición del individuo. Puesto que estos clorofenoles, así como, algunos de sus precursores se usan extensamente en numerosas actividades económicas e industriales, su concentración, según estudios realizados por diferentes autores (57,83,222,224) pueden variar entre unos pocos $\mu\text{g/L}$ en individuos no expuestos y niveles por encima del mg/L en personas que trabajan o viven en ambientes muy contaminados por estos compuestos.

De los clorofenoles estudiados, son los de mayor grado de cloración, como el pentaclorofenol y el 2,4,6-triclorofenol los de uso más frecuente siendo además los que se acumulan en mayor proporción en el organismo y los de mayor toxicidad; mientras que los de menor grado de cloración se degradan más fácilmente tanto en el medio ambiente como en el organismo.

Otro aspecto de especial importancia, relacionado con el análisis de clorofenoles en orina, es que estos compuestos normalmente se excretan en

forma de sulfatos y glucurónidos, por lo que la muestra debe ser previamente sometida a hidrólisis, con el fin de obtener los fenoles en una forma medible.

En el presente capítulo, además de estudiar la aplicabilidad de los diferentes métodos de calibración multivariante CLS, ILS, KF PCR y PLS a la determinación extractivo-espectrofotométrica de los clorofenoles contaminantes prioritarios, se hará un estudio sobre los diferentes métodos de hidrólisis de la muestra de orina.

D.2.5.a. Tratamiento de hidrólisis

Se han estudiado los tres tipos de hidrólisis que comúnmente se utilizan en este tipo de muestras: ácida, alcalina y enzimática.

En los tres casos se utilizaron muestras de orina liofilizada, la cual se puede obtener comercialmente. Una vez restituida el agua en la proporción indicada por el proveedor, alícuotas de 50 ml fueron sometidas a los diferentes tipos de hidrólisis con la finalidad de comprobar si la presencia de los productos de hidrólisis pueden constituir un serio interferente en la determinación extractivo-espectrofotométrica multivariante de fenoles.

La hidrólisis ácida se realizó calentando a reflujo, durante una hora, una alícuota a la que se le añadió 5 ml de HCl concentrado. Tras la hidrólisis, la muestra se extrajo en tetracloruro de carbono y tras eliminar el disolvente el residuo, se disolvió en 5 ml de la disolución reguladora bórico/borato, procediéndose como de costumbre para obtener su espectro UV-VIS en FIA.

Para la hidrólisis alcalina se siguió un procedimiento similar, pero utilizando 5 ml de NaOH 10M. En este caso la muestra se sometió a una doble extracción, primero en medio básico para eliminar los compuestos con carácter

neutro y básico, y después en medio ácido, que es como se extraerían los fenoles en caso de estar presentes.

Finalmente, la hidrólisis enzimática se realizó utilizando la enzima β -glucuronidasa con actividad sulfatasa. Tras una incubación de 24 horas a 37 °C, la muestra fue extraída en tetracloruro de carbono previa acidificación.

El espectro del extracto obtenido de cada una de las hidrólisis se muestra en la figura 67. Como puede observarse en dicha figura la hidrólisis básica es la que muestra un menor efecto matriz, por lo que fue elegida para la posterior determinación de los clorofenoles en muestras reales.

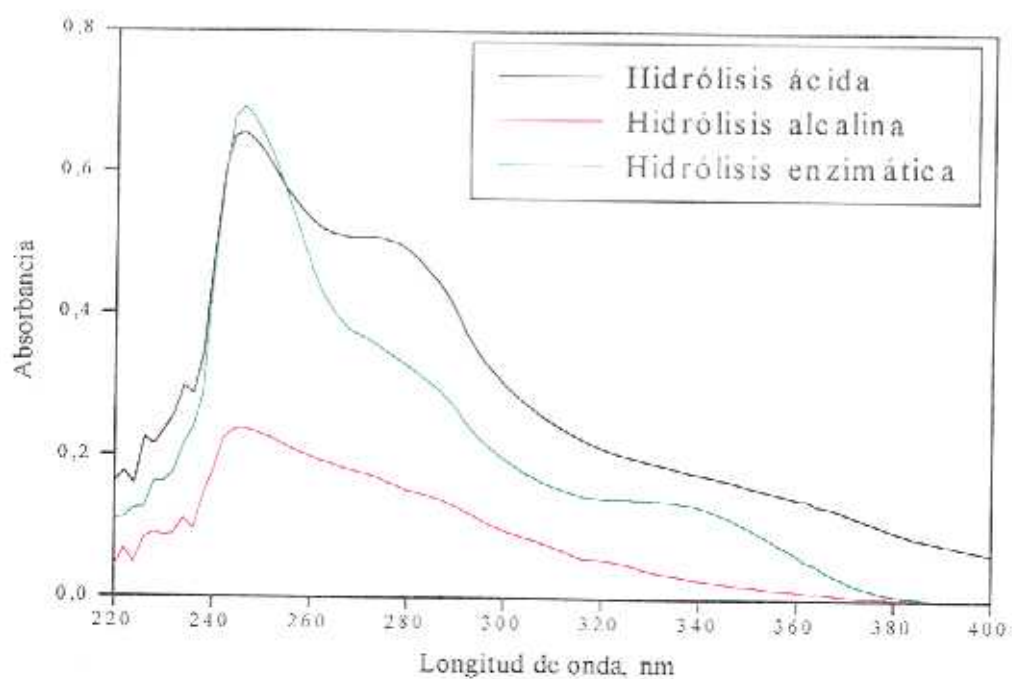


Fig. 67.- Espectros obtenidos de cada uno de los procesos de hidrólisis de la orina.

D.2.5.b. Determinación de clorofenoles en muestras de orina liofilizada

Para el estudio de la aplicabilidad de la determinación multivariante de fenoles en orina, se emplearon en primer lugar muestras de orina liofilizada obtenidas comercialmente, y que no contenían los fenoles a determinar, al menos en cantidades cuantificables por el método propuesto. Se utilizaron dos tipos de orina liofilizada, una que contenía únicamente los componentes de peso molecular menor de 10000 y otra con únicamente los componentes con peso molecular mayor de 10000, de los cuales el 60% corresponden a proteínas. A ambos tipos, después de reintegrarles el agua eliminada durante el proceso de liofilización, se les añadió entre 0.20 y 1.0 mg/L de cada clorofenol y se sometieron seguidamente al proceso de hidrólisis básica con doble extracción descrito en C.4.2.c., y a su posterior determinación multivariante en FIA. Como matriz de calibración se utilizó la misma que en las muestras de agua, y la etapa de validación se llevó a cabo con los cinco métodos multivariantes objeto del estudio (CLS, ILS, KF, PCR y PLS).

En la tabla XLVIII se muestran los resultados obtenidos en el caso en que se ha utilizado orina liofilizada con componentes con peso molecular por debajo de 10000. En ella se puede apreciar el importante efecto matriz que estos componentes tienen sobre los resultados de cuantificación, dando lugar a recuperaciones que en alguna ocasión pueden llegar hasta el 200%, así como, en algunos casos, no cuantificar los clorofenoles presentes en la muestra, como ocurre con el 2,4,6-triclorofenol y el pentaclorofenol en algunas muestras.

TABLA XLVIII. Determinación multivariante de clorofenoles en orina liofilizada (componentes con peso molecular menor de 10000).

Muestra		CLS		KF		ILS		PCR		PLS	
	P	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec
2CF	0.60	0.62	103	0.64	107	•	—	0.70	117	0.70	117
4C3MF	0.60	0.65	108	0.70	117	1.0	167	0.61	102	0.60	100
DCF	0.51	•	—	•	—	•	—	0.15	29.4	0.16	31.4
TCF	0.51	0.35	68.6	0.36	70.6	•	—	•	—	•	—
PCF	0.51	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
2CF	0.84	0.64	76.2	0.66	78.6	•	—	0.67	79.8	0.67	79.8
4C3MF	0.84	0.75	89.3	0.81	96.4	0.70	83.3	0.79	94.0	0.78	92.9
DCF	0.71	0.20	28.2	0.22	31.0	•	—	0.22	31.0	0.24	33.8
TCF	0.71	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
PCF	0.71	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
2CF	0.40	0.65	163	0.67	168	•	—	0.82	205	0.82	205
4C3MF	0.40	0.67	168	0.71	178	1.4	350	0.53	133	0.52	130
DCF	0.59	•	—	•	—	•	—	0.18	30.5	0.20	33.9
TCF	0.40	0.42	105	0.42	105	•	—	•	—	•	—
PCF	0.30	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—
2CF	0.66	0.57	86.4	0.60	90.9	•	—	0.64	97.0	0.65	98.5
4C3MF	0.66	0.53	80.3	0.79	120	0.93	141	0.64	97.0	0.63	95.5
DCF	0.99	0.39	39.4	0.40	40.4	•	—	0.66	66.7	0.67	67.7
TCF	0.66	0.54	81.1	0.57	86.4	•	—	•	—	•	—
PCF	0.51	•	—	•	—	•	—	•	—	•	—

P: Puesto (mg/L)

E: Estimado (mg/L)

Rec: Recuperación (%)

• valores por debajo del límite de detección.

Por otra parte, en el caso de la orina liofilizada que contiene aquellos componentes con peso molecular mayor de 10000, se observa, en general, recuperaciones alrededor del 100% para cada uno de los clorofenoles y métodos de calibración utilizados (tabla XLIX). Esto sugiere que la presencia de estos componentes en las muestras de orina no interfieren en la determinación multi-

TABLA XLIX. Determinación multivariante de clorofenoles en orina liofilizada (componentes con peso molecular mayor de 10000. 60% proteína).

Muestra		CLS		KF		ILS		PCR		PLS	
	P	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec
2CF	0.24	0.22	91.7	0.23	95.8	0.19	79.2	0.25	104	0.25	104
4C3MF	0.24	0.20	83.3	0.22	91.7	0.20	83.3	0.25	104	0.25	104
DCF	0.20	0.20	100	0.19	95.0	0.16	80.0	0.21	105	0.21	105
TCF	0.20	0.23	115	0.25	125	0.21	105	0.24	120	0.24	120
PCF	0.20	0.20	100	0.20	100	0.25	125	0.19	95.0	0.19	95.0
2CF	0.60	0.62	103	0.64	107	0.58	96.7	0.62	103	0.62	103
4C3MF	0.60	0.64	107	0.71	118	0.54	90.0	0.62	103	0.62	103
DCF	0.50	0.49	98.0	0.48	96.0	0.49	98.0	0.51	102	0.51	102
TCF	0.50	0.58	116	0.63	126	0.56	112	0.53	106	0.53	106
PCF	0.50	0.54	108	0.55	110	0.54	108	0.53	106	0.53	106
2CF	0.84	0.82	97.6	0.84	100	0.79	94.0	0.82	97.6	0.82	97.6
4C3MF	0.40	0.40	100	0.46	115	0.38	95.0	0.39	97.5	0.39	97.5
DCF	0.70	0.70	100	0.70	100	0.68	97.1	0.71	101	0.71	101
TCF	0.60	0.64	107	0.67	112	0.59	98.3	0.61	102	0.61	102
PCF	0.40	0.41	103	0.42	105	0.46	115	0.41	103	0.41	103

P: Puesto (mg/L)

E: Estimado (mg/L)

Rec: Recuperación (%)

variante de los clorofenoles. En consecuencia, se puede concluir que el efecto interferente de la matriz es producido principalmente por la presencia de sustancias con peso molecular inferior a 10000, y no de las proteínas o sus productos de hidrólisis.

Para minimizar en lo posible este efecto matriz se procedió a modelar esta interferencia en la etapa de calibración. Para ello, a las 50 mezclas de calibración utilizadas en los estudios anteriores, se añadieron otras 10 mezclas que contenían el extracto de orina liofilizada, así como los diferentes clorofenoles contaminantes prioritarios y cuyo diseño se muestra en la tabla L.

TABLA L. Composición de las mezclas de calibración de orina liofilizada (mg/L).

Mezcla	2CF	4C3MF	DCF	TCF	PCF
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
4	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
5	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
6	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
7	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
8	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
9	0.81	0.81	0.80	0.80	0.80
10	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Bajo estas circunstancias se llevo a cabo una nueva selección del intervalo de longitudes de onda, considerando como criterio el número de condición, siendo el intervalo seleccionado el comprendido entre 284 y 360 nm. Igualmente, se hizo un estudio de posibles mezclas de calibración que se encuentran fuera del intervalo muestral (“outliers”), semejante al realizado anteriormente para los diferentes métodos de calibración; observándose que todas ellas se encuentran dentro del nuevo intervalo muestral. Por otra parte, en el caso del PCR y PLS se cálculo el número de factores óptimos para cada uno de ellos, siendo ahora igual a 8 para ambos métodos. A partir de este conjunto de calibración, los resultados obtenidos para la orina liofilizada se muestran en la tabla LI, donde se observa, en general, una gran mejoría con respecto al anterior conjunto de calibración, siendo el PCR y el PLS los métodos de calibración que presentan los mejores resultados. Los valores de RPE y SEP se muestran en las tablas LII y LIII, donde se aprecia la potencialidad de los métodos de calibración multivariante bilineales, PLS y PCR, en comparación con el CLS, ILS y KF, en el caso de que el sistema este afectado por un gran efecto matriz. Estos resultados, muestran la mayor precisión y exactitud del PCR y PLS en comparación con el CLS, ILS y KF, los cuales muestran importantes limitaciones, aún en el caso de que la interferencia debida al efecto matriz pueda ser modelada.

Teniendo en cuenta los valores de SEP para el PCR y PLS, ambos métodos no muestran diferencias significativas entre ellos al 95% de nivel de confianza, tanto a nivel individual para cada clorofenol como a nivel global (tabla LIV). La tabla LV muestra los resultados de la recuperación media de las cuatro adiciones de clorofenoles contaminantes prioritarios realizadas a la matriz de orina liofilizada y cuyos resultados individuales se mostraron en la tabla LI.

TABLA LI. Resultados de la determinación multivariante de clorofenoles en orina liofilizada. Conjunto de calibración: tablas XXVIII y L (60 mezclas).

Muestra		CLS		KF		ILS		PCR		PLS	
	P	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec	E	Rec
2CF	0.60	0.41	68.3	0.41	68.3	0.89	148	0.65	108	0.68	113
4C3MF	0.60	0.34	56.7	0.34	56.7	0.64	107	0.56	93.3	0.59	98.3
DCF	0.51	0.44	86.3	0.44	86.3	0.59	116	0.49	96.1	0.51	100
TCF	0.51	0.15	29.4	0.16	29.1	0.70	137	0.56	110	0.55	108
PCF	0.51	0.31	60.8	0.31	60.8	0.60	118	0.51	100	0.49	96.1
2CF	0.84	0.49	61.3	0.50	59.5	0.99	118	0.88	105	0.92	110
4C3MF	0.84	0.51	60.7	0.52	61.9	0.68	81.0	0.85	101	0.89	106
DCF	0.71	0.65	91.5	0.67	94.4	0.63	88.7	0.72	101	0.74	104
TCF	0.71	0.21	29.6	0.35	50.0	0.56	78.8	0.72	101	0.70	98.6
PCF	0.71	0.28	39.4	0.29	40.8	0.74	104	0.73	103	0.69	97.2
2CF	0.40	0.26	65.0	0.23	57.5	1.3	325	0.53	133	0.59	148
4C3MF	0.40	0.12	30.0	0.07	17.5	0.95	238	0.37	92.5	0.41	103
DCF	0.59	0.53	89.8	0.52	88.1	1.3	220	0.61	103	0.65	110
TCF	0.40	0.09	22.5	0.24	60.0	0.94	235	0.45	113	0.44	110
PCF	0.30	0.17	56.7	0.17	56.7	0.49	163	0.32	107	0.29	96.7
2CF	0.66	0.41	62.1	0.42	63.6	0.63	95.5	0.60	90.0	0.63	95.5
4C3MF	0.66	0.46	69.7	0.47	71.2	0.63	95.5	0.60	90.0	0.63	95.5
DCF	0.99	0.89	89.9	0.89	89.9	0.98	99.0	0.95	96.0	0.98	99.0
TCF	0.66	0.22	33.3	0.40	60.0	0.62	93.9	0.63	95.5	0.62	93.9
PCF	0.51	0.43	84.3	0.44	86.3	0.53	104	0.56	110	0.53	104

P: Puesto (mg/L)

E: Estimado (mg/L)

Rec: Recuperación (%)

TABLA LII. RPE(%) de cada clorofenol y MRPE(%) para cada método de calibración en orina liofilizada.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	38	38	78	12	17
4-cloro-3-metilfenol	39	44	45	6.1	5.0
2,4-diclorofenol	10	10	48	3.4	4.9
2,4,6-triclorofenol	70	83	51	7.0	6.3
Pentaclorofenol	47	46	20	5.4	3.8
MRPE	42	46	49	7.9	9.7

TABLA LIII. SEP (mg/L) de cada clorofenol y SEPT (mg/L) para cada método de calibración en orina liofilizada.

Clorofenol	CLS	KF	ILS	PCR	PLS
2-clorofenol	0.24	0.24	0.50	0.08	0.11
4-cloro-3-metilfenol	0.25	0.28	0.29	0.04	0.03
2,4-diclorofenol	0.07	0.07	0.34	0.03	0.03
2,4,6-triclorofenol	0.41	0.48	0.30	0.04	0.04
Pentaclorofenol	0.25	0.24	0.11	0.03	0.02
SEPT	0.27	0.30	0.33	0.05	0.06

TABLA LIV. F calculado para cada clorofenol.
Comparación entre el método PCR
y PLS. Orina liofilizada.

Clorofenol	F _{cal}
2-clorofenol	1.9
4-cloro-3-metilfenol	1.8
2,4-diclorofenol	1.0
2,4,6-triclorofenol	1.0
Pentaclorofenol	2.3
Total	1.4

$$F_{\text{crit.}}(95\%) = 6.39$$

TABLA LV. Recuperación media (%) de cada clorofenol
obtenida mediante PCR y PLS. Orina liofilizada.*

Clorofenol	PCR	PLS
2-clorofenol	109 ± 29	117 ± 35
4-cloro-3-metilfenol	94 ± 8	101 ± 7
2,4-diclorofenol	99 ± 6	103 ± 8
2,4,6-triclorofenol	105 ± 13	103 ± 12
Pentaclorofenol	105 ± 6	99 ± 6

* n = 4

D.2.5.c. Determinación de clorofenoles en muestras de orina humana

Los estudios realizados anteriormente ponen de manifiesto que el PCR y PLS son métodos de calibración multivariante suficientemente potentes como para predecir la concentración de los diferentes clorofenoles contaminantes prioritarios en muestras que presentan un acusado efecto matriz, como es el caso de la orina. Sin embargo, esta capacidad predictiva está en parte condicionada por la posibilidad de poder modelar este efecto matriz en la etapa de calibración.

Puesto que los estudios anteriores se han hecho sobre orina liofilizada que no contenía compuestos con peso molecular superior a 10000, y aunque se ha comprobado en el estudio anterior, que estas sustancias por si solas no muestran efecto interferente sobre la determinación multivariante de clorofenoles, se ha querido hacer un posterior estudio para ver si es posible determinar estos clorofenoles de forma simultánea mediante el método FIA propuesto, cuando la orina no ha sido sometida a ningún proceso previo de eliminación de proteínas y otros compuestos de alto peso molecular.

El estudio se realizó utilizando orina recogida a primera hora de la mañana, correspondiente a tres individuos varones jóvenes, aparentemente sanos y no expuestos laboralmente a clorofenoles o compuestos relacionados con estos, que por degradación en el organismo puedan ser excretados como tales clorofenoles. Alícuotas de 50 ml de orina de estos individuos que contenían entre 0.20 y 1.0 mg/L de los diferentes clorofenoles, se sometieron al proceso de hidrólisis básica y extracción descrito en C.4.2.c., determinándose seguidamente el contenido de cada clorofenol mediante el método FIA propuesto, y aplicando los métodos de calibración multivariante PCR y PLS,

utilizando como referencia los mismos datos de calibración empleados en el estudio anterior.

Los resultados de recuperaciones medias obtenidos para cada uno de estos individuos se muestran en la tabla LVI, donde se aprecia que el valor teórico del 100% de recuperación cae dentro de los límites de confianza de los valores medios encontrados para los tres individuos y los dos métodos de calibración, con la excepción del 2-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol del individuo A cuando se estima su contenido mediante PCR.

Como sea que en los estudios realizados en el apartado D.2.5.b. se puso de manifiesto la no existencia de diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante PCR y PLS, se procedió a realizar una evaluación de los resultados obtenidos mediante PCR y PLS de los clorofenoles correspondientes al individuo A, utilizando para ello el test no paramétrico de Wilcoxon. Esta prueba se utiliza para la comparación de métodos cuando se considera que los obtenidos por cada uno de ellos se distribuyen simétricamente pero no siguen una distribución normal o Gaussiana. Mediante la aplicación de esta prueba se encontró que los resultados obtenidos para el individuo A mediante PCR y PLS no presentan diferencias significativas al 95% de nivel de probabilidad, por lo que se puede afirmar que ambos métodos son totalmente válidos para la determinación simultánea de 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol por el método FIA propuesto y en matrices de orina humana.

TABLA LVI. Recuperación media e intervalo de confianza (%) obtenidos para cada clorofenol e individuo.*

		Individuo A		Individuo B		Individuo C	
Clorofenol	Puesto (mg/L)	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR	PLS
2-clorofenol	0.40-1.0	129 ± 25	104 ± 18	113 ± 31	112 ± 31	114 ± 51	121 ± 38
4-cloro-3-metilfenol	0.40-1.0	102 ± 11	95 ± 5	101 ± 7	98 ± 6	113 ± 16	108 ± 15
2,4-diclorofenol	0.40-1.0	81 ± 40	85 ± 41	104 ± 14	103 ± 14	106 ± 30	111 ± 28
2,4,6-triclorofenol	0.20-0.80	118 ± 11	106 ± 10	101 ± 10	100 ± 6	110 ± 28	100 ± 8
Pentaclorofenol	0.20-0.80	91 ± 7	100 ± 6	103 ± 16	105 ± 19	107 ± 47	100 ± 10

* n = 6

E. CONCLUSIONES

MÉTODO MANUAL

Estudio extractivo-espectrofotométrico de los clorofenoles en presencia de sales de amonio cuaternario.

1.- La capacidad de formación de pares iónicos con las sales de amonio cuaternario estudiadas, Hyamina-3500 (Hy-3500), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), nitrato de tetrabutilamonio (TBA), nitrato de tetrapropilamonio (TPA) y nitrato de tetrametilamonio (TMA), aumenta con el grado de cloración y por consiguiente con la disminución de su pKa. Para fenoles muy clorados es posible la formación del par iónico con sales de amonio cuaternario de menor tamaño, según se desprende de los siguientes hechos:

- *2-clorofenol*: se extrae con Hy-3500 a $\text{pH} > 10$ mediante formación de par iónico. A pHs inferiores se extrae en forma neutra en presencia de todas las sales de amonio cuaternario estudiadas.

- *4-cloro-3-metilfenol*: solamente se extrae en forma neutra.
- *2,4-diclorofenol*: se extrae mediante formación de par iónico con Hy-3500 y CTAB a $\text{pH} > 10$. A pH s inferiores o en presencia de las otras sales de amonio cuaternario, solamente se extrae en forma neutra.
- *2,4,6-triclorofenol*: se extrae como par iónico en equilibrio con la forma neutra a $\text{pH} > 4.7$ con las sales de amonio cuaternario Hy-3500 y CTAB y con TBA, TPA y TMA a $\text{pH} > 7.4$. A $\text{pH} > 10$ este clorofenol se extrae preferentemente como par iónico en presencia de todas las sales de amonio cuaternario estudiadas, con excepción del TMA.
- *Pentaclorofenol*: este fenol se extrae preferentemente como par iónico a $\text{pH} > 4.7$ en presencia de todas las sales de amonio cuaternario estudiadas, con excepción del TMA.

2.- A pH 9.1 y en presencia de TBA, únicamente el 2,4,6-triclorofenol y el pentaclorofenol se extraen en forma de par iónico, mientras que el 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol y 2,4-diclorofenol se extraen en forma neutra. La presencia de la sal de amonio cuaternario favorece la extracción de estos clorofenoles en forma neutra, incluso a pH s superiores a su pK_a , debido, posiblemente, a cambios en la tensión superficial. Esta sal de amonio cuaternario presenta la ventaja sobre la Hy-3500 y CTAB, de que no forma emulsiones a ninguno de los pH s estudiados, lo que permite una mayor reproducibilidad de los espectros.

3.- Se han estudiado tres disolventes orgánicos de uso frecuente en el laboratorio (1,2-dicloroetano, cloroformo y tetracloruro de carbono) para la extracción de los clorofenoles en presencia de TBA y a pH 9.1, encontrándose que ninguno de ellos afecta a la extracción del 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol, mientras que el 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol presentan

una menor absorbancia en las bandas del par iónico cuando se utiliza el tetracloruro de carbono.

4.- El estudio de la influencia de la concentración de TBA en el proceso extractivo, muestra que a partir de una relación $[TBA]/[fenol] \geq 30$ la intensidad de las bandas de absorción correspondientes a la extracción de los diferentes clorofenoles, alcanza un valor prácticamente constante.

5.- Como consecuencia del estudio extractivo-espectrofotométrico de los clorofenoles en presencia de sales de amonio cuaternario, se proponen las siguientes condiciones experimentales para la extracción de los clorofenoles y su posterior determinación espectrofotométrica:

Sal de amonio cuaternario	TBA
pH	9.1
[TBA], mg/L	500
Disolvente orgánico	cloroformo

Determinación simultánea de clorofenoles mediante un método directo de regresión clásica de mínimos cuadrados (CLS).

6.- En las condiciones experimentales propuestas, el 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol presentan espectros de absorción reproducibles, mientras que en el 2,4,6-triclorofenol no se da esta reproducibilidad, debido probablemente a que la formación del par iónico, en este caso, está controlado por una cinética lenta.

7.- Para la determinación extractivo-espectrofotométrica simultánea de 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol mediante

un método directo CLS, basado en el empleo de espectros de referencia obtenidos a partir de disoluciones individuales de dichos clorofenoles, se decidió la utilización de la derivada de primer orden ya que los estudios estadísticos basados en el error relativo de predicción (RPE) y en el error estándar de predicción (SEP) para cada clorofenol presentaron mejores resultados con respecto a la utilización de la derivada de orden cero (absorbancia).

8.- Igualmente, se eligió el intervalo de longitud de onda comprendido entre 250 y 380 nm como el óptimo para el análisis multicomponente, por ser este el que presenta los menores valores error relativo de predicción medio (MREP) y error estándar total de predicción (SEPT).

9.- Mediante regresión lineal de mínimos cuadrados CLS y utilizando el espectro de absorción derivado, y en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 250 y 380 nm, se han resuelto mezclas cuaternarias, ternarias y binarias de 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol en el intervalo comprendido entre 3 y 15 mg/L para cada clorofenol, obteniéndose los siguientes resultados:

- El 4-cloro-3-metilfenol y el 2,4-diclorofenol son los dos clorofenoles que se determinan con una mayor precisión y exactitud, con valores de RPE de 8.2% y 6.8% y de SEP de 0.6 mg/L y 0.5 mg/L, respectivamente. Igualmente ambos clorofenoles muestran un buen nivel de correlación.
- El 2-clorofenol es el que muestra una menor precisión y exactitud con respecto a los demás clorofenoles (RPE=17.7% y SEP=1.5 mg/L), dando lugar, en general, a resultados inferiores al valor teórico a todos los niveles de concentración.

- El pentaclorofenol presenta un RPE y SEP intermedio con respecto a los otros tres clorofenoles (RPE=13.3%, SEP=1.1 mg/L), sin embargo, el modelo de calibración utilizado no presenta una correlación razonable entre la concentración estimada y la real ($R^2=0.719$) por lo que el modelo de calibración utilizado no se puede considerar totalmente correcto para el caso particular de este clorofenol.

Determinación simultánea de clorofenoles mediante calibración multivariante CLS y espectrofotometría derivada.

10.- Se han resuelto mezclas cuaternarias, ternarias y binarias de 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol en el intervalo comprendido entre 3 y 15 mg/L para cada clorofenol obteniéndose los siguientes resultados:

- El 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol y 2,4-diclorofenol muestran valores de RPE prácticamente similares (4.0%, 4.1% y 4.8%, respectivamente), mientras que el pentaclorofenol presenta un valor de RPE algo superior (6.5%). Por otra parte, considerando los valores de SEP, no muestran diferencias significativas entre ellos, mostrando, igualmente, buen nivel de correlación.
- Comparando los resultados de los métodos directo y multivariante, se observa en este último caso una gran mejoría en cuanto a precisión y exactitud, obteniéndose un valor de RPE del orden de cuatro veces inferior para el caso del 2-clorofenol y de dos veces inferior para el caso del 4-cloro-3-metilfenol y pentaclorofenol, siendo el 2,4-diclorofenol el que presenta una menor disminución de este valor. Por otra parte, los valores de R^2 para los cuatro clorofenoles, es superior al obtenido mediante el método directo.

Determinación simultánea de clorofenoles mediante diferentes métodos de calibración multivariante. Estudio comparativo de los métodos CLS, ILS, KF, PCR, PLS

11.- Del estudio de la influencia del número de mezclas utilizadas en el proceso de calibración sobre la precisión de los cuatro métodos de calibración multivariante estudiados; regresión de mínimos cuadrados clásico (CLS), filtro de Kalman (KF), regresión de inverso (ILS), regresión de componentes principales (PCR) y regresión parcial de mínimos cuadrados (PLS), se deduce que a partir de un número determinado de mezclas (20 para el CLS, ILS y KF y 15 para el PCR y PLS), la precisión en la determinación de cada uno de los clorofenoles (SEP) alcanza un valor prácticamente constante.

12.- Del estudio de la influencia de las longitudes de onda seleccionadas para la determinación de los clorofenoles mediante CLS, KF, PCR y PLS, se desprende que la utilización del espectro completo da lugar, en general, a resultados menos exactos y precisos que cuando se utiliza un número determinado de longitudes, previamente seleccionado mediante el número de condición de la matriz \mathbf{K} de calibración ($\text{cond}(\mathbf{K})$) o la mejor la relación señal/ruido (S/N).

13.- Los resultados de predicción obtenidos para los cuatro clorofenoles, utilizando para cada método de calibración multivariante el número óptimo de longitudes de onda seleccionadas y partiendo en cada caso del conjunto de mezclas de calibración seleccionado, muestran que, con excepción del ILS, no existen diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% entre los valores de SEP obtenidos cuando la selección de longitudes de onda se realiza mediante el $\text{cond}(\mathbf{K})$ o mediante la relación S/N, lo que indica que cualquiera de estos métodos de selección de las longitudes de onda son igualmente válidos.

MÉTODO AUTOMÁTICO (FIA)

14.- La optimización de las variables hidrodinámicas y químicas condujo a proponer las siguientes condiciones experimentales:

Variables hidrodinámicas:

Volumen de inyección:	250 μ l
Caudal:	
Portador	1.5 ml/min
Reactivo (TBA)	1.2 ml/min
Fase orgánica (CHCl_3)	0.6 ml/min
Reactor:	
Longitud (cm)	30 cm
Diámetro interno (mm)	0.3 mm
Bucle de extracción:	
Longitud (cm)	130 cm
Diámetro interno (mm)	0.3 mm

Variables químicas:

pH	9.1
Fuerza iónica (NaCl)	0.05 M
[TBA]	1500 mg/L

Algunas de estas variables propuestas como óptimas, son el resultados de un compromiso entre la sensibilidad y la velocidad de muestreo.

15.- El empleo de la técnica FIA conduce a una mayor reproducibilidad en la extracción del par iónico del 2,4,6-triclorofenol con respecto al procedimiento manual, lo que permite la determinación de este clorofenol junto con los cuatro estudiados en el método manual.

Determinación de clorofenoles mediante calibración multivariante por FIA y espectrofotometría derivada

16.- Se estudian cinco métodos de calibración multivariante: CLS, ILS, KF, PCR y PLS. En todos los casos se parte de un diseño de calibración de 50 mezclas generadas aleatoriamente para concentraciones de cada clorofenol comprendidas entre 0 y 10 mg/L. La etapa de validación se lleva a cabo con un conjunto de 36 mezclas en igual intervalo de concentración. La selección del intervalo de longitudes de onda para la estimación de la concentración de los clorofenoles se realiza mediante el criterio del mínimo número de condición de la matriz de calibración ($\text{cond}(K)$), encontrándose que los resultados más precisos y exactos se dan para el intervalo comprendido entre 286 y 338 nm.

17.- La selección del número óptimo de factores o variables latentes a aplicar en PCR y PLS se ha hecho mediante validación de cruce y siguiendo los criterios estadísticos de Osten y Eastment y Krzanowski y del PRESS, conduciendo todos ellos a un valor óptimo de 6 factores tanto para PCR como para PLS. De estos 6 factores seleccionados, cinco corresponden con toda probabilidad a las cinco causas conocidas de variación, es decir, los cinco clorofenoles, mientras que el sexto corresponderá a un factor cuya naturaleza no ha sido asignada de forma definitiva, correspondiendo posiblemente a una contribución a la variación espectral de origen instrumental o químico.

18.- La detección de posibles mezclas de calibración que se encuentran fuera del intervalo muestral ("outliers") se ha llevado a cabo siguiendo los criterios del efecto leva ("leverage") los residuales de Student y la distancia de Cook, no detectándose ninguna de ellas para ninguno de los métodos de calibración multivariante estudiados, lo que indica que el diseño de calibración empleado es suficientemente representativo del sistema.

19.- Aplicando el método automático FIA propuesto, se han resuelto mezclas de cinco, cuatro, tres y dos clorofenoles en el intervalo de concentración comprendido entre 2 y 10 mg/L, obteniendo una buena correlación entre las cantidades reales y las estimadas. De los métodos de calibración multivariante estudiados, CLS, KF, PCR y PLS presentan resultados similares en cuanto a precisión y exactitud, no así el ILS el cual muestra diferencias significativas con respecto a los otros métodos cuando se compara el error estándar de predicción total (SEPT) al nivel de confianza del 95%.

Determinación multivariante de clorofenoles en diferentes tipos de aguas

20.- El método automático FIA propuesto se ha aplicado a la determinación, en diferentes tipos de aguas, de clorofenoles contaminantes prioritarios en concentraciones comprendidas entre 0 y 200 µg/L, previa preconcentración en una resina polimérica XAD-4, con los siguientes resultados:

- Se obtienen recuperaciones medias alrededor del 100% para todos los clorofenoles y métodos de calibración estudiados en el caso de que la muestra de agua no presente efecto matriz como es el caso del agua purificada mediante un aparato de Milli Q o en el caso de agua de consumo público. En el caso del agua de río las recuperaciones medias son ligeramente menores, pero en todos los casos, superiores al 81.8%.
- De los métodos de calibración multivariante estudiados, el CLS es el que presenta los resultados más precisos y exactos en aquellas aguas con menor contenido de materia orgánica (agua Milli Q y agua de consumo público), mientras que en aguas con mayor contenido de materia orgánica como el agua de río, son el PCR y PLS los métodos que ofrecen los mejores resultados.

Determinación multivariante de clorofenoles en orina humana

21.- Del estudio de los tres procedimientos de hidrólisis (ácida, alcalina y enzimática) realizados sobre una muestra de orina liofilizada, la hidrólisis básica es la que presenta un menor efecto matriz y, por lo tanto, la más adecuada, en principio, para la determinación de los clorofenoles en este tipo de muestra.

22.- La determinación multicomponente de clorofenoles en orina humana se encuentra fuertemente interferida por el efecto matriz que suponen los componentes naturales presentes. Este efecto interferente de la matriz es debido principalmente a la presencia de compuestos de peso molecular inferior a 10000.

23.- El efecto matriz de los componentes de la orina pueden ser modelado en el proceso de calibración multivariante, incluyendo, en el diseño de calibración, varias mezclas que contengan orina liofilizada y fenoles añadidos en concentraciones conocidas. La aplicación del método automático FIA propuesto permite obtener resultados precisos y exactos cuando la determinación se realiza mediante PCR y PLS.

24.- La aplicación de los métodos PCR y PLS en la determinación de los cinco clorofenoles en muestras de orina humana a la que se añaden clorofenoles en concentraciones comprendidas entre 0.20 y 1.0 mg/L, da lugar a recuperaciones medias no significativamente diferentes del valor teórico del 100%. De tres muestras correspondientes a tres individuos diferentes, sólo se han encontrado desviaciones importantes en un solo individuo cuando la estimación se hace mediante PCR. No obstante mediante la aplicación de un test no paramétrico (prueba de Wilcoxon) a los resultados de este individuo, no se observan diferencias significativas al 95% entre los métodos PCR y PLS en la determinación de estos clorofenoles.

25.- Como conclusión final, puede decirse que la determinación extractivo-espectrofotométrica de los clorofenoles contaminantes prioritarios 2-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol es posible utilizando procedimientos matemáticos basados en métodos de calibración multivariante, no siendo necesaria la separación previa de los analitos. El método propuesto puede ser fácilmente automatizado mediante un sistema FIA y puede ser aplicado tanto a muestras de agua como a muestras con matriz más compleja como el caso de la orina. De los cinco métodos de calibración multivariante, el CLS rinde resultados precisos y exactos en muestras con poco efecto matriz, mientras que en muestras con un efecto matriz más acusado, son los métodos bilineales, como el PCR y PLS, los que conducen a mejores resultados.

F. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- MORRISON, R.T.; BOYD, R.N. "Química Orgánica". Fondo Educativo Interamericano, S.A. (Méjico) (1985).
- 2.- THURMAN, E.M. "Organic Geochemistry of Natural Waters". Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers (Holanda) (1985).
- 3.- BUIKEMA, A.L., Jr.; MCGINNISS, M.J.; CAIRNS, J., Jr., *Mar. Environ. Res.*, **2**, 87 (1979).
- 4.- RAUZY, S.; DANJOU, J., *J. Fr. Hydrol.*, **24**, 233 (1993).
- 5.- HERVE, S., *Water Sci. Technol.*, **24**, 397 (1991).
- 6.- SERVOS, M.R.; CAREY, J.H.; FERGUSON, M.L.; VAN DER KRAAK, G., FERGUSON, H.; PARROTT, J.; GORMAN, K.; COWLING, R., *Water Pollut. Res. J. Can.*, **27**, 423 (1992).
- 7.- MORALES, A.; BIRKHOLZ, D.A.; HRUDEY, S.E., *Water. Environ. Res.*, **64**, 669 (1992).
- 8.- LAMPI, P.; VARTIAINEN, T.; TUOMISTO, J.; HESSO, A., *Chemosphere*, **20**, 625 (1990).
- 9.- SITHOLE, B.B.; WILLIAMS, D.T., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 807 (1986).
- 10.- VEL LEITNER, N.K.; DELAAT, J.; DORE, M.; SUTY, H.; POUILLOT, M., *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 222 (1994).
- 11.- LAHANIATIS, E.S.; BERGEHEIM, W.; KOTZIAS, D.; PILIDIS, G., *Chemosphere*, **28**, 229 (1994).
- 12.- MA, J.; LI, G.; YAN, X., *Tongji Daxue Xuebao*, **21**, 349 (1993) (Chem. Abst. 120:306922a).
- 13.- CUNNINGHAM, J.; SEDLAK, P., *J. Photochem. Photobiol.*, **77**, 255 (1994).

- 14.- SEIDELL, A. "Solubilities of Organic Compounds". D. Van Nostrand Company, Inc. (Nueva York) (1941).
- 15.- REALINI, P.A., *J. Chromatogr. Sci.*, **19**, 124 (1981).
- 16.- VAN OVERBEEK, J. "Survey of Mechanisms of Herbicide Action". The Physiology and Biochemistry of Herbicides; Audus, L.J. Academic Press, Inc. (Londres) (1964).
- 17.- ARGESE, E.; BETTIOL, C.; GHELLI, A.; TODESCHINI, R.; MIANA, P., *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**, 363 (1995).
- 18.- BORZELLECA, J.F.; CONDIE, L.W.; HAYES, J.R. Technical Report EPA-6001D-84-234 (1984).
- 19.- RIPQPT (REGISTRO INTERNACIONAL DE PRODUCTOS QUIMICOS POTENCIALMENTE TOXICOS). Boletín RIPQPT, 7, 32 (1985).
- 20.- HAMILTON, S.J.; CLEVELAND, L.; SMITH, L.M.; LEBO, J.A.; MAYER, F.L. *Environ. Toxicol. Chem.*, **5**, 543 (1986).
- 21.- RAPPE, C. The Handbook of Environmental Chemistry. O. Hutzinger, Springer-Verlag (Berlin) Vol 3, Parte A, 157 (1980).
- 22.- BANERJEE, S.; HOWARD, P.H.; ROSENBERG, A.M.; DOMBROWSKI, A.E.; SIKKA, H.; TULLIS, D.L. *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 416 (1984).
- 23.- BANERJEE, S.; HOWARD, P.H.; TULLIS, D.L. *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 374 (1985).
- 24.- KISHINO, T.; KOBAYASHI, K., *Water Res.*, **29**, 431 (1995).
- 25.- SCHULTZ, T.W.; RIGGIN, G.W., *Toxicol. Lett.*, **25**, 47 (1985).
- 26.- ESSER, H.O., *Pestic. Sci.*, **17**, 265 (1986).
- 27.- JANSSON, K.; JANSSON, V., *Toxicol. Lett.*, **69**, 289 (1993).
- 28.- KALLIOKOSKI, P.; KAUPPINEN, T., *IARC Sci. Publ.*, **104**, 390 (1990).
- 29.- LINDROOS, L.; KOSKINEN, H.; MUTANEN, P.; JARVISALO, J., *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **59**, 463 (1987).
- 30.- BENTLEY, R.K.; HORSTMAN, S.W.; MORGAN, M.S., *Appl. Ind. Hyg.*, **4**, 69 (1989).
- 31.- KRAUSE, C.; CHUTSCH, M.; ENGLERT, N., *Environ. Int.*, **15**, 443 (1989).
- 32.- GRATZFELD HUESGEN, A.; SCHUSTER, R., *LC-GC Int.*, **4**, 40 (1991).
- 33.- EPA. "Quality Criteria for Water". EPA-440/9-76-023 (1976).
- 34.- CEE (80/778/CEE). "Directiva del Consejo del 15 de Julio de 1980 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano". Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 15/Vol. 02, L229/174 (30-8-1980).

- 35.- PRIMO YUFERA, E.; CARRASCON DORRIEN, J.M. "Química Agrícola". Vol. II. Alhambra. (Madrid) (1980).
- 36.- BRATT, R.P.; SQUIRRELL, D.J.; MILLINGTON, S.; MANTON, G.; HOSKINS, W., *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **29**, 61 (1992).
- 37.- LANGMAIER, F., *Kozarstvi*, **43** (Zvladni Cislo 1), 12 (1993) (Chem. Abst. 120:79809y).
- 38.- WAZNY, J.; KUNDREWICZ, A.; LUTOMSKI, K., *Drev. Vysk.*, **38**, 3 (1993). (Chem. Abst. 120:194292m).
- 39.- SHEN, Y.S.; KU, Y.; LEE, K.C., *Toxicol. Environ. Chem.*, **54**, 51 (1996).
- 40.- HAKULINEN, R.; WOODS, S.; FERGUSON, J.; BENJAMIN, M., *Water Sci. Technol.*, **17**, 289 (1985).
- 41.- PARKER, W.J.; BELL, J.P.; MELCER, H., *Environ. Progress*, **13**, 98 (1994).
- 42.- ARMENANTE, P.M.; KAFKEWITZ, D.; LEWANDOWSKI, G.; KUNG, C.M., *Environ. Progress*, **11**, 113 (1992).
- 43.- PUHAKKA, J.A.; HERWIG, R.P.; KORO, P.M.; WOLFE, G.V.; FERGUSON, J.F., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 951 (1995).
- 44.- DEC, J.; BOLLAG, J.M., *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 657 (1995).
- 45.- BUNCE, N.J.; NAKAI, J.S., *JAPCA*, **39**, 820 (1989).
- 46.- VOLLMUTH, S.; NIESSNER, R., *Chemosphere*, **30**, 2317 (1995).
- 47.- EPA. "Priority Pollutant List". Federal Register, **44**, 233 (1979).
- 48.- DOBBS, R.A.; WANG, L.; GOVIND, R., *Environ. Sci. Technol.*, **23**, 1092 (1989).
- 49.- PANGREKAR, J.; KLOPMAN, G.; ROSENKRANZ, H.S., *Environ. Toxicol. Chem.*, **13**, 979 (1994).
- 50.- ZHAO, F.; MAYURA, K.; HUTCHINSON, R.W.; LEWIS, R.P.; BURGHARDT, R.C.; PHILLIPS, T.D., *Toxicol. Lett.*, **78**, 35 (1995).
- 51.- HAMILTON, S.J.; CLEVELAND, L.; SMITH, L.M.; LEBO, J.A.; MAYER, F.L., *Environ. Toxicol. Chem.*, **5**, 543 (1986).
- 52.- YOUNT, J.D.; RICHTER, J.E., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**, 51 (1986).
- 53.- NEBEKER, A.V.; GRIFFIS, W.L.; SCHUYTEMA, G.S., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 33 (1994).
- 54.- JARVIS, S.N.; STRAU, R.S.; WILLIAMS, A.L.J.; BARTLETT, C.L.R., *British Medical Journal*, **290**, 1800 (1985).
- 55.- AHLBORG, U.G.; THUNBERG, T.M., *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **7**, 1 (1980).
- 56.- DOUGHERTY, R.C., *Anal. Contam. Edible Aquat. Resour.*, 453 (1994).

- 57.- CROMPTON, T.R. "Determination of Organic Substances in Water". Vol. 2. Wiley (Nueva York) (1985).
- 58.- TESAROVA, E.; PACAKOVA, V., *Chromatographia*, **17**, 269 (1983).
- 59.- BOSCH REIG, F.; CAMPINS FALCO, P.; VERDU ANDRES, J., *J. Liq. Chromatogr.*, **18**, 2229 (1995).
- 60.- WALL, A.J.; STRATTON, G.W., *Chemosphere*, **22**, 99 (1991).
- 61.- BOOTH, R.A.; LESTER, J.N., *J. Chromatogr. Sci.*, **32**, 259 (1994).
- 62.- BAIOCCHI, C.; ROGGERO, M.A.; GIACOSA, D.; MARENGO, E., *J. Chromatogr. Sci.*, **33**, 338 (1995).
- 63.- BUSTO, O.; OLUCHA, J.C.; BORRULL, F., *Chromatographia*, **32**, 566 (1991).
- 64.- BALLESTEROS, E.; GALLEGU, M.; VALCARCEL, M., *J. Chromatogr.*, **518**, 59 (1990).
- 65.- BALLESTEROS, E.; GALLEGU, M.; VALCARCEL, M., *Anal. Chem.*, **62**, 1587 (1990).
- 66.- KELLY, A.G.; CRUZ, I.; WELLS, D.E., *Anal. Chim. Acta*, **276**, 3 (1993).
- 67.- VASILIC, Z.; FINGLER, S.; DREVENKAR, V., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **341**, 732 (1991).
- 68.- LI, S.F.Y.; LEE, H.K.; ONG, C.P., *Int. J. Environ. Stud.*, **38**, 19, (1991).
- 69.- VAN LEEUWEN, J.A.; NICHOLSON, B.C.; HAYES, K.P., *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **44**, 825 (1993).
- 70.- COOPER, J.F.; TOURTE, J.; GROS, P., *Chromatographia*, **38**, 147 (1994).
- 71.- CLADERA, A.; GOMEZ, E.; ESTELA, J.M.; CERDA, V., *Anal. Chim. Acta*, **267**, 103 (1992).
- 72.- KORENMAN, Y.I.; NIFTALIEV, S.I.; TORGOU, V.G.; DROZDOVA, M.K., *Zh. Prikl. Khim.*, **66**, 168 (1993). (Chem. Abst. 119:168550d)
- 73.- KORENMAN, Y.I.; NIFTALIEV, S.I.; GOROKHOV, A.A., *Zh. Prikl. Khim.*, **66**, 2296 (1993). (Chem. Abst. 121:141085k)
- 74.- KORENMAN, Y.I.; NIFTALIEV, S.I., *Zh. Prikl. Khim.*, **66**, 372 (1993). (Chem. Abst. 119:124701z)
- 75.- KORENMAN, Y.I.; NIFTALIEV, S.I., *Khim. Tekhnol. Vody*, **15**, 120 (1993). (Chem. Abst. 118:240031j)
- 76.- KORENMAN, Y.I.; NIFTALIEV, S.I., *Zh. Prikl. Khim.*, **66**, 1763 (1993). (Chem. Abst. 120:145707s)
- 77.- KORENMAN, Y.I., YERMOLAEVA, T.N., *Analyst*, **120**, 2387 (1995).
- 78.- CHEN, P.H.; VAN AUSDALE, W.A.; KEERAN, W.S.; ROBERTS, D.F., *Chemosphere*, **26**, 1743 (1993).
- 79.- BARTH, R.C.; FAIR, P.S., *J. Am. Water Works Assoc.*, **84**, 94 (1992).

- 80.- FREBORTOVA, J.; TATARKOVICOVA, V., *Analyst*, **119**, 1519 (1994).
- 81.- FINGLER, S.; TKALCEVIC, B.; FROBE, Z.; DREVENKAR, V., *Analyst*, **119**, 1135 (1994).
- 82.- RUANA, J.; URBE, I.; BORRULL, F., *J. Chromatogr.*, **655**, 217 (1993).
- 83.- VENINGEROVA, M.; PRACHAR, V.; UHNAK, J.; LUKACSOVA, M.; TRONVEC, T., *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, **657**, 103 (1994).
- 84.- GAWDZIK, J.; GWADZIK, B.; CZERWINSKA-BIL, U., *J. Chromatogr.*, **509**, 135 (1990).
- 85.- PEREZ ARRIBAS, L.V.; LEON GONZALEZ, M.E.; POLO DIEZ, L.M., *Analisis*, **22**, 369 (1994).
- 86.- NAVARRO VILLOSLADA, F.; PEREZ ARRIBAS, L.V.; LEON GONZALEZ, M.E.; POLO DIEZ, L.M., *Anal. Chim. Acta*, **308**, 238 (1995).
- 87.- PISSOLATTO, T.M.; CARAMAO, E.B.; MARTINS, A.F., *J. Microcolumn Sep.*, **8**, 5 (1996).
- 88.- ZHI, Z.L.; RIOS, A.; VALCARCEL, M., *Analyst*, **121**, 1 (1996).
- 89.- DE RUITER, C.; BOHLE, J.F.; DE JONG, G.J.; BRINKMAN, U.A.Th.; FREI, R.W., *Anal. Chem.*, **60**, 666 (1988).
- 90.- POCURULL, E.; MARCE, R.M.; BORRULL, F., *J. Chromatogr. A*, **738**, 1 (1996).
- 91.- PIANGERELLI, V.; NERINI, F.; CAVALLI, S., *Ann. Chim.*, **83**, 331 (1993).
- 92.- ELVIRA COZAR, C.; CANO FAURA, P.; PEREZ ARRIBAS, L.V.; LEON GONZALEZ, M.E.; POLO DIEZ, L.M., *Chromatographia*, **40**, 91 (1995).
- 93.- BUTLER, E.C.V.; DAL PONT, G., *J. Chromatogr.*, **609**, 113 (1992).
- 94.- NOREN, K.; SJÖVALL, J., *J. Chromatogr.*, **414**, 55 (1987).
- 95.- MORENO-ROMAN, C.; MONTERO-ESCOLAR, M.R.; LEON-GONZALEZ, M.E.; PEREZ-ARRIBAS, L.V.; POLO-DIEZ, L.M., *Anal. Chim. Acta*, **288**, 259 (1994).
- 96.- PATTON, G.W.; McCONNELL, L.L.; ZARANSKI, M.T.; BIDLEMAN, T.F., *Anal. Chem.*, **64**, 2858 (1992).
- 97.- EL-SHAHAWI, M.S., *Talanta*, **41**, 1481 (1994).
- 98.- DI CORCIA, A.; BELLIONI, A.; MADBOULY, M.D.; MARCHESE, S., *J. Chromatogr. A*, **733**, 383 (1996).
- 99.- TURNES, M.I.; RODRIGUEZ, I.; MEJUTO, M.C.; CELA, R., *J. Chromatogr. A*, **683**, 21 (1994).
- 100.- DI CORCIA, A.; MARCHESE, S.; SAMPERI, R.; CECCHINI, G.; CIRILLI, L., *J. AOAC Int.*, **77**, 446 (1994).
- 101.- VREULS, J.J.; DE JONG, G.J.; GHIJSEN, R.T.; BRINKMAN, U.A.Th., *J. Microcolumn Sep.*, **5**, 317 (1993).

- 102.- SWAMI, K.; NARANG, R.S., *J. AOAC Int.*, **77**, 1304 (1994).
- 103.- DI CORCIA, A.; MARCHESE, S.; SAMPERI, R., *J. Chromatogr.*, **642**, 175 (1993).
- 104.- ANIELAK, P.; JANIO, K.; JANKOWSKI, J., *Environ. Sci. Res.*, **42**, 789 (1991).
- 105.- ALARCON, P.; BUSTOS, A.; CAÑAS, B.; ANDRES, M.D.; POLO, L.M., *Chromatographia*, **24**, 613 (1987).
- 106.- SIEGRIST, J.; SALLES, C.; ETIEVANT, P., *Chromatographia*, **35**, 50 (1993).
- 107.- ZHOU, S.W.; MALAIYANDI, M.; BENOIT, F.M., *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, **38**, 439 (1990).
- 108.- MALAIYANDI, M.; SHAH, S.M., *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, **43**, 103 (1991).
- 109.- POCURULL, E.; CALULL, M.; MARCE, R.M.; BORRULL, F., *Chromatographia*, **38**, 579 (1994).
- 110.- POCURULL, E.; MARCE, R.M.; BORRULL, F., *Chromatographia*, **40**, 85 (1995).
- 111.- PUIG, D.; BARCELO, D., *Chromatographia*, **40**, 435 (1995).
- 112.- GELENCSE, A.; KISS, G.; KRIVACSY, Z.; VARGA-PUCHONY, Z.; HLAVAY, J., *J. Chromatogr. A*, **693**, 227 (1995).
- 113.- LEE, H.B.; PEART, T.E.; HONG-YOU, R.L., *J. Chromatogr.*, **636**, 263 (1993).
- 114.- BREWER, S.E.; KRUUS, P., *J. Environ. Sci. Health, Part B*, **B28**, 671 (1993).
- 115.- THOMSON, C.A.; CHESNEY, D.J., *Anal. Chem.*, **64**, 848 (1992).
- 116.- HAWTHORNE, S.B.; MILLER, D.J., *Anal. Chem.*, **66**, 4005 (1994).
- 117.- BUCHHOLZ, K.D.; PAWLISZYN, J., *Anal. Chem.*, **66**, 106 (1994).
- 118.- MELCHER, R.G.; BAKKE, D.W.; HUGHES, G.H., *Anal. Chem.*, **64**, 2258 (1992).
- 119.- RODRIGUEZ-GONZALO, E.; PEREZ-PAVON, J.L.; RUZICKA, J.; CHRISTIAN, G.D.; OLSON, D.C., *Anal. Chim. Acta*, **259**, 37 (1992).
- 120.- YANG, M.J.; PAWLISZYN, J., *Anal. Chem.*, **65**, 2538 (1993).
- 121.- SCHMIDT, L.; SUN, J.J.; FRITZ, J.S.; HAGEN, D.F.; MARKELL, C.G.; WISTED, E.E., *J. Chromatogr.*, **641**, 57 (1993).
- 122.- PRAUS, P., *Anal. Chim. Acta*, **302**, 39 (1995).
- 123.- JENKINS, E.H.; BAUGH, P.J., *Anal. Proc.*, **30**, 441 (1993).
- 124.- LIU, Y.; LOPEZ AVILA, V.; ALCARAZ, M.; JONES, T.L., *Anal. Chem.*, **66**, 4483 (1994).
- 125.- TANG, P.H.T.; HO, J.S., *J. High Resolut. Chromatogr.*, **17**, 509 (1994).
- 126.- MOHLER, E.F.; JACOB, L.N., *Anal. Chem.*, **29**, 1369 (1957).

- 127.- AFGHAN, B.K.; BELLIVEAU, P.E.; LAROSE, R.H.; RYAN, J.F., *Anal. Chim. Acta*, **71**, 355 (1974).
- 128.- CUNGUANG, Y; GUANGDONG, L.; CHENGWU, F.; HONGYING, X., *Shiyou Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, **17**, 87 (1993). (Chem. Abst. 120:279615u).
- 129.- FOUNTAINE, J.E.; JOSHIPURA, P.B.; KELIHER, P.N.; JOHNSON, J.D. *Anal. Chem.*, **46**, 62 (1974).
- 130.- FOUNTAINE, J.E.; JOSHIPURA, P.B.; KELIHER, P.N.; JOHNSON, J.D. *Anal. Chem.*, **47**, 157 (1975).
- 131.- SECCHIERI, M.; BENASSI, C.A.; PASTORE, S.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A.; LEVORATO, M.; GUERRATO, A., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 674 (1991).
- 132.- BARANOWSKA, T.; PIESZKO, C., *Chem. Anal. (Warsaw)*, **40**, 649 (1995).
- 133.- CEE (79/869/CEE). "Directiva del Consejo de 9 de Octubre de 1979 relativa a los métodos de medición y la frecuencia de los muestreos y del análisis de las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable de los Estados miembros". *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*. 15/Vol. 02, L271/44 (29-10-79).
- 134.- "Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water". American Public Health Association. Washington, DC. 16th edn., part 510 (1985).
- 135.- ISO 6439. "Water Quality. Determination of phenol index. 4-aminoantipyrine spectrometric methos after distillation". (1990).
- 136.- NORWITZ, G.; BARDSLEY, A.H.; KELIHER, P.N., *Anal. Chim. Acta*, **128**, 251 (1981).
- 137.- NORWITZ, G.; KELIHER, P.N., *Anal. Chim. Acta*, **144**, 273 (1982).
- 138.- KURIHARA, M., *Bunseki Kagaku*, **32**, 766 (1983). (Chem. Abst. 100:73651f)
- 139.- COTE, R.; NADEAU, D., *Anal. Lett.*, **26**, 87 (1993).
- 140.- FRENZEL, W.; OLEKSY-FRENZEL, J.; MÖLLER, J., *Anal. Chim. Acta*, **261**, 253 (1992).
- 141.- RODRIGUEZ ALCALA, M.; YAÑEZ SEDEÑO, P.; POLO DIEZ, L.M., *Talanta*, **35**, 601 (1988).
- 142.- GALES, M.E., Jr., *Analyst*, **100**, 841 (1975).
- 143.- ESTEVE ROMERO, J.S.; ALVAREZ RODRIGUEZ, L.; GARCIA ALVAREZ COQUE, M.C.; RAMIS RAMOS, G., *Analyst*, **119**, 1381 (1994).
- 144.- KUPLETSKAYA, N.B.; TIKHONOVA, T.N.; KASHIN, A.N., *Zh. Anal. Khim.*, **43**, 2070 (1988). (Chem. Abst. 111:224600u)
- 145.- ZOLOTAREVA, O.I.; SAVOSTINA, V.M.; BELYAEVA, T.V., *Zh. Anal. Khim.*, **42**, 1655 (1987). (Chem. Abst. 108:68021m)
- 146.- KOPPE, P.; DIETZ, F.; TRAUD, J.; RUEBELT, C., *Fresenius Z Anal. Chem.*, **285**, 1 (1977).

- 147.- RAO, K.E.; SASTRY, C.S., *Mikrochim. Acta*, **I**, 313 (1984).
- 148.- KOCH, S.; ACKERMANN, G.; LINDNER, P., *Talanta*, **39**, 693 (1992).
- 149.- VERMA, P.; GUPTA, V.K., *J. Indian Chem. Soc.*, **60**, 591 (1983).
- 150.- BAVEJA, A.K.; GUPTA, V.K., *J. Indian Chem. Soc.*, **61**, 348 (1984).
- 151.- DAS, J.V.; GUPTA, V.K., *Chem. Anal. (Warsaw)*, **39**, 693 (1994).
- 152.- NAVARRO VILLOSLADA, F.; PEREZ ARRIBAS, L.V.; LEON GONZALEZ, M.E.; SANTOS DELGADO, M.J.; POLO DIEZ, L.M., *Organohalogen Compd.*, **2**, 199 (1990).
- 153.- NAVARRO VILLOSLADA, F.; LEON GONZALEZ, M.E.; PEREZ ARRIBAS, L.V.; SANTOS DELGADO, M.J.; POLO DIEZ, L.M., *Microchem. J.*, **44**, 339 (1991).
- 154.- NAVARRO VILLOSLADA, F.; PEREZ ARRIBAS, L.V.; LEON GONZALEZ, M.E.; SANTOS DELGADO, M.J.; POLO DIEZ, L.M., *Talanta*, **38**, 1341 (1991).
- 155.- LEON GONZALEZ, M.E.; PEREZ ARRIBAS, L.V.; SANTOS DELGADO, M.J.; POLO DIEZ, L.M., *Anal. Chim. Acta*, **269**, 258 (1992).
- 156.- SHERMAN, L.R.; TRUST, V.L.; HOANG, H., *Spectra 2000*, **7**, 41 (1979).
- 157.- CLADERA, A.; GOMEZ, E.; ESTELA, J.M.; CERDA, V., *Anal. Chim. Acta*, **267**, 95 (1992).
- 158.- VELASCO, A.; RUI, X.; SILVA, M.; PEREZ BENDITO, D., *Talanta*, **40**, 1505 (1993).
- 159.- PEREZ ARRIBAS, L.V.; NAVARRO VILLOSLADA, F.; LEON GONZALEZ, M.E.; POLO DIEZ, L.M., *J. Chemometrics*, **7**, 267 (1993).
- 160.- NAVARRO VILLOSLADA, F.; PEREZ ARRIBAS, L.V.; LEON GONZALEZ, M.E.; POLO DIEZ, L.M., *Anal. Chim. Acta*, **313**, 93 (1995).
- 161.- VERDU ANDRES, J.; BOSCH REIG, F.; CAMPINS FALCO, P., *Analyst*, **120**, 299 (1995).
- 162.- MARTIN, M.; OTTO, M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **352**, 451 (1995).
- 163.- SWEILEH, J.A.; DASGUPTA, P.K.; LOPEZ, J.L., *Mikrochim. Acta*, **3**, 175 (1987).
- 164.- FRENZEL, W.; KREKLER, S., *Anal. Chim. Acta*, **310**, 437 (1995).
- 165.- KWADE, C.; VOIGTLÄNDER, R.; CAMMANN, K., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **342**, 426 (1992).
- 166.- ISO/CD 14402. "Water Quality. Determination of Phenolindex by flow analysis" (1995).
- 167.- BERMUDEZ, B.; LAZARO, F.; LUQUE DE CASTRO, M.D.; VALCARCEL, M., *Analyst*, **112**, 535 (1987).
- 168.- ZHANG, P.; LITTLEJOHN, D., *Analyst*, **118**, 1065 (1993).
- 169.- MAKUCH, B.; GAZDA, K.; KAMINSKI, M., *Anal. Chim. Acta*, **284**, 53 (1993).
- 170.- LANIN, S.N.; NIKITIN, Y.S., *Talanta*, **36**, 573 (1989).

- 171.- MARIS, F.A.; STAB, J.A.; DE JONG, G.J.; BRINKMAN, U.A.Th., *J. Chromatogr.*, **445**, 129 (1988).
- 172.- BARCELO, D.; DURAND, G.; VREEKEN, R.J.; DE JONG, G.J.; BRINKMAN, U.A.Th., *Anal. Chem.*, **62**, 1696 (1992).
- 173.- DE RUITER, C.; BRINKMAN, J.H.W.; FREI, R.W.; LINGEMAN, H.; BRINKMAN, U.A.Th.; VAN ZOONEN, P., *Analyst*, **115**, 1033 (1990).
- 174.- HAGEN, A.; MATTUSCH, J.; WERNER, G., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339**, 26 (1991).
- 175.- BATLEY, G., *J. Chromatogr.*, **389**, 409 (1987).
- 176.- GRATZFELD HUESGEN, A.; SCHUSTER, R., *Hewlett-Packard Appl. Note*, **12**, 5952-1548 (1990).
- 177.- KAPHALIA, B.S., *J. Chromatogr.*, **537**, 85 (1991).
- 178.- ANDRES, M.D.; CAÑAS, B.; IZQUIERDO, R.C.; POLO, L.M.; ALARCON, P., *J. Chromatogr.*, **507**, 399 (1990).
- 179.- SHAHWAN, G.J.; JEZOREK, J.R., *J. Chromatogr.*, **256**, 39 (1983).
- 180.- GRIESER, M.D.; PIETRZYK, D.J., *Anal. Chem.*, **45**, 1348 (1973).
- 181.- PIETRZYK, D.J.; CHU, C.H., *Anal. Chem.*, **49**, 860 (1977).
- 182.- FORGACS, E.; CSERHATI, T.; BORDAS, B., *Chromatographia*, **36**, 19 (1993).
- 183.- PALEOLOGOU, M.; LI, S.; PURDY, W.C., *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 319 (1990).
- 184.- GALCERAN, M.T.; JAUREGUI, O., *Anal. Chim. Acta*, **304**, 75 (1995).
- 185.- BARCELO, D., *Chromatographia*, **25**, 295 (1988).
- 186.- LAMOREE, M.H.; GHUJSEN, R.T.; BRINKMAN, U.A.Th., *Tech. Instrum. Anal. Chem.*, **13** (Environmental Analysis), 521 (1993).
- 187.- MARIS, F.A.; DE JONG, G.J.; SOMSEN, G.W.; BRINKMAN, U.A.Th., *Chemosphere*, **17**, 1301 (1988).
- 188.- KWAKMAN, P.J.M.; KAMMINGA, D.A.; BRINKMAN, U.A.Th.; DE JONG, G.J., *J. Chromatogr.*, **553**, 345 (1991).
- 189.- NOVAK, T.J.; GRAYESKI, M.L., *Microchem. J.*, **50**, 151 (1994).
- 190.- BROWN, R.S.; AMATEIS, P.G.; TAYLOR, L.T., *Chromatographia*, **18**, 396 (1984).
- 191.- DEM'YANOV, P.I., *Zh. Anal. Khim.*, **47**, 1942 (1992). (Chem. Abst. 119:108145r)
- 192.- CARLSON, R.M.; SWANSON, T.A.; OYLER, A.R.; LUKASEWYCZ, M.T.; LIUKKONEN, R.J.; VOELKNER, K.S., *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 272 (1984).
- 193.- LI, C.Y.; KEMP, M.W., *J. Chromatogr.*, **455**, 241 (1988).

- 194.- FAYYAD, M.K.; ALAWI, M.A.; EL-AHMED, T.J., *Chromatographia*, **28**, 465 (1989).
- 195.- BIGLEY, F.P.; GROB, R.L., *J. Chromatogr.*, **350**, 407 (1985).
- 196.- KWAKMAN, P.J.M.; MOL, J.G.J.; KAMMINGA, D.A.; FREI, R.W.; BRINKMAN, U.A.Th.; DE JONG, G.J., *J. Chromatogr.*, **459**, 139 (1988).
- 197.- LAMPRECHT, G.; HUBER, J.F.K., *J. Chromatogr.*, **667**, 47 (1994).
- 198.- BOURGUIGNON, B.; MARCENAC, F.; KELLER, H.R.; de AGUIAR, P.F.; MASSART, D.L., *J. Chromatogr.*, **628**, 171 (1993).
- 199.- BUSTO, O.; OLUCHA, J.C.; BORRULL, F., *Chromatographia*, **32**, 423 (1991).
- 200.- MARKOWSKI, W.; DZIDO, T.H.; SOCZEWSKI, E., *J. Chromatogr.*, **523**, 81 (1990).
- 201.- CHEE, K.K.; LAN, W.G.; WONG, M.K.; LEE, H.K., *Anal. Chim. Acta*, **312**, 271 (1995).
- 202.- HANAI, T.; HATANO, H.; NIMURA, N.; KINOSHITA, T., *Analyst*, **119**, 1167 (1994).
- 203.- ROSES, M.; BOSCH, E., *Anal. Chim. Acta*, **274**, 147 (1993).
- 204.- PARK, J.; JANG, M.; KIM, S., *Bull. Korean Chem. Soc.*, **11**, 297 (1990).
- 205.- CABALLERO, M.; CELA, R.; PEREZ BUSTAMANTE, J.A., *Anal. Lett.*, **21**, 63 (1988).
- 206.- VAN ROOSMALEN, P.B.; KLEIN, A.L.; DRUMMOND, I., *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **45**, 57 (1980).
- 207.- BALIKOVA, M.; NOVAKOVA, E.; KOHLICEK, J., *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, **75**, 431 (1988).
- 208.- HOLLSTEIN, A., *Nahrung*, **35**, 1029 (1991).
- 209.- MANGANI, F.; FABBRI, A.; CRESCENTINI, G.; BRUNER, F., *Anal. Chem.*, **58**, 3261 (1986).
- 210.- LEE, H.B.; HONG-YOU, R.L.; FOWLIE, P.J.A., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 979 (1989).
- 211.- CRUZ, I.; WELLS, D.E., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **48**, 101 (1992).
- 212.- ABDEL-REHIM, M.; HASSAN, M.; EHRSSON, H., *J. High Resolut. Chromatogr.*, **14**, 284 (1991).
- 213.- SNYDER, A.P.; HARDEN, C.S.; BRITTAI, A.H.; KIM, M.G.; ARNOLD, N.S.; MEUZELAAR, H.L.C., *Anal. Chem.*, **65**, 299 (1993).
- 214.- WILLIAMS, D.T.; TRAN, Q.; FELLIN, P.; BRICE, K.A., *J. Chromatogr.*, **549**, 297 (1991).
- 215.- RENNER, G., *Toxicol. Environ. Chem.*, **27**, 217 (1990).
- 216.- BESNER, A.; GILBERT, R.; TETREAULT, P.; LEPINE, L.; ARCHAMBAULT, J.F., *Anal. Chem.*, **67**, 442 (1995).

- 217.- RODRIGUEZ, I.; BOLLAIN, M.H.; GARCIA, C.M.; CELA, R., *J. Chromatogr. A*, **733**, 405 (1996).
- 218.- BERTRAND, M.J.; STEFANIDIS, S.; DONAIS, A.; SARRASIN, B., *J. Chromatogr.*, **354**, 331 (1986).
- 219.- COOPER, J.F.; TOURTE, J.; GROS, P., *Chromatographia*, **38**, 147 (1994).
- 220.- FOERST, C.; SIMON, H.; STIEGLITZ, L., *Chemosphere*, **26**, 1355 (1993).
- 221.- LEE, H.B.; WENG, L.D.; CHAU, A.S.Y., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 1086 (1984).
- 222.- BENGTSSON, G., *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 397 (1985).
- 223.- KONTSAS, H.; ROSENBERG, C.; PFÄFFLI, P.; JÄPPINEN, P., *Analyst*, **120**, 1745 (1995).
- 224.- LEE, H.B.; HONG-YOU, R.L.; CHAU, A.S.Y., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 422 (1985).
- 225.- ANGERER, J.; HEINZOW, B.; SCHALLER, K.H.; WELTLE, D.; LEHNERT, G., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **342**, 433 (1992).
- 226.- LEE, H.B.; CHAU, A.S.Y. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 1029 (1983).
- 227.- DANO, S.D.; CHAMBON, P.; CHAMBON, R.; SANOU, A., *Analisis*, **14**, 538 (1986).
- 228.- HAJŠLOVA, J.; KOCOUREK, V.; ZEMANOVA, L.; PUDIL, F.; DAVIDEK, J., *J. Chromatog.*, **439**, 307 (1988).
- 229.- HAJŠLOVA, J.; TAHTAH, W.H.; JEHLICKOVA, Z.; KOCOUREK, V.; CUHRA, P., *Sci. Total Environ.*, **132**, 259 (1993).
- 230.- KRAMER, A.; ANGERER, J., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **351**, 327 (1995).
- 231.- HOLLER, J.S.; FAST, D.M.; HILL, R.H., Jr.; CARDINALI, F.L.; TODD, G.D.; McCRAW, J.M.; BAILEY, S.L.; NEEDHAM, L.L., *J. Anal. Toxicol.*, **13**, 152 (1989).
- 232.- KORZEKWA, K.; HOWALD, W.N.; TRAGER, W.F., *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **19**, 211 (1990).
- 233.- JURASEK, P.; BREZNY, R.; KOSIK, M., *Chem. Pap.*, **46**, 184 (1992). (Chem. Abst. 117:219595r)
- 234.- GUMPRECHT, D.L., *J. Chromatogr.*, **595**, 368 (1992).
- 235.- MOHAMMAD, A.; AJMAL, M.; ANWAR, S., *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, **5**, 286 (1992).
- 236.- PETROVIC, M.; KASTELAN-MACAN, M.; HORVAT, A.J.M., *J. Chromatogr.*, **607**, 163 (1992).
- 237.- LEPRI, L.; DESIDERI, P.G.; HEIMLER, D., *J. Chromatogr.*, **248**, 308 (1982).
- 238.- BARANOWSKA, I.; SKOTNICZNA, A., *Chromatographia*, **39**, 564 (1994).

- 239.- FERRY, J.; LARSON, R.A., *J. Chromatogr. Sci.*, **29**, 476 (1991).
- 240.- THIELEMAN, H., *Sci. Pharm.*, **46**, 130 (1978).
- 241.- SHERMA, J.; MCGINNIS, S.C., *J. Liq. Chromatogr.*, **18**, 755 (1995).
- 242.- WARDAS, W.; PYKA, A., *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, **4**, 334 (1991).
- 243.- KORENMAN, Y.I.; KRYUKOV, A.I., *Zh. Anal. Khim.*, **45**, 1140 (1990). (Chem. Abst. 113:144620b)
- 244.- LASKAR, S.; SENGUPTA, B.; DAS, J., *J. Indian Chem. Soc.*, **66**, 899 (1989).
- 245.- SHERMA, J.; BOLDNIEKS, J., *J. Liq. Chromatogr.*, **13**, 3941 (1990).
- 246.- KUMAR, H.; SHARMA, A.; CHIBBER, S.S., *J. Chromatogr.*, **245**, 126 (1982).
- 247.- FUTTER, J.E.; WALL, P., *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, **6**, 372 (1993).
- 248.- PYKA, A., *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, **8**, 219 (1995).
- 249.- SCHNEIDER, G., *Int. Lab.*, **22**, 26 (1992).
- 250.- ONG, C.P.; LEE, H.K.; LI, S.F.Y., *J. Chromatogr. Sci.*, **30**, 319 (1992).
- 251.- ONG, C.P.; LEE, H.K.; LI, S.F.Y., *Anal. Chem.*, **62**, 1389 (1990).
- 252.- YEO, S.K.; ONG, C.P.; LEE, H.K.; LI, S.F.Y., *Environ. Monit. Assess.*, **19**, 47 (1991).
- 253.- DRESSMAN, S.F.; SIMEONE, A.M.; MICHAEL, A.C., *Anal. Chem.*, **68**, 3121 (1996).
- 254.- WADE, A.L.; HAWKRIDGE, F.M.; WILLIAMS, H.P., *Anal. Chim. Acta*, **105**, 91 (1979).
- 255.- McCrory-Joy, C., *Anal. Chim. Acta*, **141**, 105 (1982).
- 256.- CAÑETE, F.; RIOS, A.; LUQUE DE CASTRO, M.D.; VALCARCEL, M., *Anal. Chim. Acta*, **214**, 375 (1988).
- 257.- GUIJARRO, E.C.; YAÑEZ SEDEÑO, P.; PINGARRON CARRAZON, J.M.; POLO DIEZ, L.M., *Analyst*, **113**, 625 (1988).
- 258.- GUIJARRO, E.C.; YAÑEZ SEDEÑO, P.; PINGARRON CARRAZON, J.M.; POLO DIEZ, L.M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339**, 193 (1991).
- 259.- RUIZ BARRIO, M.A.; PINGARRON CARRAZON, J.M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **344**, 34 (1992).
- 260.- OTHMAN, B.; HILL, J.O.; MAGEE, R.J., *Mikrochim. Acta*, **I**, 171 (1986).
- 261.- LIBERTI, A.; MORGIA, C.; MASCINI, M., *Anal. Chim. Acta*, **173**, 157 (1985).
- 262.- WEISSHAAR, D.E.; TALLMAN, D.E.; ANDERSON, J.L., *Anal. Chem.*, **53**, 1809 (1981).
- 263.- YAÑEZ SEDEÑO, P.; CHICO GUIJARRO, E.; PINGARRON CARRAZON, J.M.; POLO DIEZ, L.M., *Microchem. J.*, **41**, 366 (1990).

- 264.- CHRISTOPHERSEN, M.J.; CARDWELL, T.J., *Anal. Chim. Acta*, **323**, 39 (1996).
- 265.- LIU, F.; REVIEJO, A.J.; PINGARRON, J.M.; WANG, J., *Talanta*, **41**, 455 (1994).
- 266.- WANG, J.; LU, F.; LOPEZ, D., *Analyst*, **119**, 455 (1994).
- 267.- WANG, J.; LU, F.; LOPEZ, D., *Biosens. Bioelectron.*, **9**, 9 (1994).
- 268.- KOTTE, H.; GRÜNDIG, B.; VORLOP, K.D.; STREHLITZ, B.; STOTTMEISTER, U., *Anal. Chem.*, **67**, 65 (1995).
- 269.- HALL, G.F.; BEST, D.J.; TURNER, A.P.F., *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 543 (1988).
- 270.- MARKO-VARGA, G.; LO GORTON, J.E.; RUZGAS, T., *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **14**, 319 (1995).
- 271.- NAKAI, T.; SATO, Y., *Kogai Shigen Kenkyusho Iho*, **15**, 47 (1985). (Chem. Abst. 105:66068w)
- 272.- MARLEY, N.A.; MANN, C.K.; VICKERS, T.J., *Appl. Spectrosc.*, **39**, 628 (1985).
- 273.- DONKERBROEK, J.J.; VELTKAMP, A.C.; GOOIJER, C.; VELTHORST, N.H.; FREI, R.W., *Anal. Chem.*, **55**, 1886 (1983).
- 274.- PEREZ RUIZ, T.; MARTINEZ LOZANO, C.; TOMAS MARTINEZ, V.; LOPEZ BALSERA, C.I., *Anal. Quim.*, **86**, 534 (1990).
- 275.- ZHUANG, H.S.; ZHANG, F.; WANG, Q., *Analyst*, **120**, 121 (1995).
- 276.- LI, G.; LOCKE, D.C., *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.*, **669**, 93 (1995).
- 277.- TURNES, M.I.; MEJUTO, M.C.; CELA, R., *J. Chromatogr. A*, **733**, 395 (1996).
- 278.- PRAUS, P.; DOMBEK, V., *Anal. Chim. Acta*, **277**, 97 (1993).
- 279.- PRAUS, P.; DOMBEK, V., *Anal. Chim. Acta*, **281**, 397 (1993).
- 280.- PRAUS, P.; DOMBEK, V., *Anal. Chim. Acta*, **283**, 917 (1993).
- 281.- VAN EMON, J.M.; GERLACH, R.W., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **48**, 635 (1992).
- 282.- ALIMPIEV, S.S.; MLYNSKI, V.V.; BELOV, M.E.; NIKIFOROV, S.M., *Anal. Chem.*, **67**, 181 (1995).
- 283.- RAFII, E.; FAURE, R.; LENA, L.; VINCENT, E.J.; METZGER, J., *Anal. Chem.*, **57**, 2854 (1985).
- 284.- BOE. "Real Decreto 1138/1990 del 14 de Septiembre, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público". 226/477 (20-9-1990).
- 285.- BOE. "Resolución del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación sobre el Pentaclorofenol". 62/6964 (13-3-1984).
- 286.- ISO 8165-1. "Water Quality. Determination of selected monovalent phenols". (1992)

- 287.- EPA method 604. Phenols. "Federal Register, October 26, 1984, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136", p. 58.
- 288.- EPA method 625. Base/neutrals and acids. "Federal Register, October 26, 1984, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136", p. 153.
- 289.- SHACKELFORD, W.M.; MCGUIRE, J.M., *Spectra*, **10**, 17 (1986).
- 290.- CEE (86/280/CEE). "Directiva del Consejo de 12 de Junio de 1986 relativa a los valores límites y los objetivos de calidad para los residuos de determinadas sustancias comprendidas en la lista I del Anexo de la Directiva 76/464/CEE". Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L181/16 (4-7-1986).
- 291.- BOE. "Orden de 12 de Noviembre de 1987 sobre normas de emisión, objetivos de calidad y métodos de medición de referencia relativos a determinadas sustancias nocivas o peligrosas contenidas en los vertidos de aguas residuales". 280/34790 (23-11-1987).
- 292.- CEE (75/440/CEE). "Directiva del Consejo de 16 de Junio de 1975 relativa a la calidad requerida para las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los Estados miembros". Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 15/Vol. 01, L149/33 (25-7-75).
- 293.- CEE (76/160/CEE). "Directiva del Consejo de 8 de Diciembre de 1975 relativa a la calidad de las aguas de baño". Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 15/Vol. 01, L31/1 (5-2-1976).
- 294.- CEE (78/659/CEE). "Directiva del Consejo de 18 de Julio de 1978 relativa a la calidad de las aguas continentales que requieren protección o mejora para ser aptas para la vida de los peces". Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 15/Vol. 02, L222/1 (14-8-78).
- 295.- ZYKA, J. "Instrumentation in Analytical Chemistry". Vol: 2. Ellis Horwood Ltd. (Londres) (1994).
- 296.- FENG, D., *Ion-Sel. Electrode Rev.*, **9**, 95 (1987).
- 297.- VALCARCEL, M.; SILVA, M. "Teoría y práctica de la extracción líquido-líquido". Alhambra (Madrid) (1984).
- 298.- TOEI, K., *Anal. Sci.*, **36**, 479 (1987).
- 299.- DUBOST, J.P.; COLLETER, J.C., *Analisis*, **8**, 300 (1980).
- 300.- SANTOS-DELGADO, M.J.; PEREZ-ARRIBAS, L.V.; LEON-GONZALEZ, M.E.; POLO-DIEZ, L.M., *Fresenius Z Anal. Chem.*, **334**, 705 (1989).
- 301.- RAKHMAN'KO, E.M.; STAROBINETS, G.L.; YEGOROV, V.V.; GULEVICH, A.L.; LESTCHEV, S.M.; BOROVSKI, E.S.; TSYGANOV, A.R., *Fresenius Z Anal. Chem.*, **335**, 104 (1989).
- 302.- KALKANDJIEV, T.K.; PETROV, V.P.; NICKOLOV, J.B., *Appl. Spectrosc.*, **43**, 44 (1989).
- 303.- FELL, A.F.; SMITH, G., *Anal. Proc.*, **19**, 28 (1982).
- 304.- CAMERON, D.G.; MOFFATT, D.J., *Appl. Spectrosc.*, **41**, 539 (1987).

- 305.- JONES, R., *Analyst*, **112**, 1495 (1987).
- 306.- TALSKY, G., *Fresenius Z Anal. Chem.*, **333**, 702 (1989).
- 307.- DOL, I.; KNOCHEN, M.; ALTESOR, C., *Analyst*, **116**, 69 (1991).
- 308.- O'HAVER, T.C.; GREEN, G.L., *Inter. Lab.*, **5/6**, 11 (1975).
- 309.- HOLLER, F.; BURNS, D.H.; CALLIS, J.B., *Appl. Spectrosc.*, **43**, 877 (1989).
- 310.- O'HAVER, T.C.; GREEN, G.L., *Anal. Chem.*, **48**, 312 (1976).
- 311.- KNOCHEN, M.; DOL, I., *Analyst*, **117**, 1385 (1992).
- 312.- DAVIDSON, A.G., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **3**, 329 (1985).
- 313.- KIMBRELL, S.M.; BOOKSH, K.; STOLZBERG, R.J., *Appl. Spectrosc.*, **46**, 704 (1992).
- 314.- JUHL, L.L.; KALIVAS, J.H., *Anal. Chim. Acta*, **187**, 347 (1986).
- 315.- SEASHOLTZ, M.B.; KOWALSKI, B.R., *Appl. Spectrosc.*, **44**, 1337 (1990).
- 316.- KOINIS, S.P.; TSATSAS, A.T.; KATAKIS, D.F., *J. Chemometrics*, **5**, 21 (1991).
- 317.- KARSTANG, T.V.; KVALHEIM, O.V., *Anal. Chem.*, **63**, 767 (1991).
- 318.- GEROW, D.D.; RUTAN, S.C., *Anal. Chim. Acta*, **184**, 53 (1986).
- 319.- LEVILLAIN, P.; FOMPEYDIE, D., *Analisis*, **14**, 1 (1986).
- 320.- SANCHEZ ROJAS, F.; BOSCH OJEDA, C.; CANO PAVON, J.M., *Talanta*, **35**, 753 (1988).
- 321.- HOWELL, J.A.; HARGIS, L.G.; SUTTON, R.E., *Anal. Chem.*, **68**, 196R (1996).
- 322.- DUPUY, N.; DUPONCHEL, L.; AMRAM, B.; HUVENNE, J.P.; LEGRAND, P., *J. Chemometrics*, **8**, 333 (1994).
- 323.- BLANCO, M.; COELLO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; BERTRAN, E., *Appl. Spectrosc.*, **49**, 747 (1995).
- 324.- DOL, I.; KNOCHEN, M.; VIERAS, E., *Analyst*, **117**, 1373 (1992).
- 325.- VILCHEZ QUERO, J.L.; ROHAND, J.; AVIDAD CASTAÑEDA, R.; NAVALON, A.; CAPITAN VALLVEY, L.F., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **350**, 626 (1994).
- 326.- LOPEZ DE ALDA VILLAIZAN, M.J.; GARCIA FALCON, M.S.; GONZALEZ AMIGO, S.; SIMAL LOZANO, J.; LAGE YUSTY, M.A., *Talanta*, **43**, 1405 (1996).
- 327.- GARCIA SANCHEZ, F.; CRUCES BLANCO, C., *Anal. Chim. Acta*, **222**, 177 (1989).
- 328.- BLANCO, M.; GENE, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; RIBA, J., *Talanta*, **34**, 987 (1987).
- 329.- GARCIA, J.M.; HERNANDEZ, O.; JIMENEZ, A.I.; JIMENEZ, F.; ARIAS, J.J., *Anal. Chim. Acta*, **317**, 83 (1995).

- 330.- SALINAS, F.; BERZAS NEVADO, J.J.; ESPINOSA MANSILLA, A., *Talanta*, **37**, 347 (1990).
- 331.- BERZAS NEVADO, J.J.; GUIBERTEAU CABANILLAS, C.; SALINAS, F., *Talanta*, **39**, 547 (1992).
- 332.- BERZAS NEVADO, J.J.; GUIBERTEAU CABANILLAS, C.; CONTENTO SALCEDO, A.M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **350**, 606 (1994).
- 333.- WAHBI, A.A.M.; EL-YAZBI, F.A.; BARARY, M.H.; SABRI, S.M., *Analyst*, **117**, 785 (1992).
- 334.- JIMENEZ, A.I.; JIMENEZ, F.; ARIAS, J.J., *Analyst*, **114**, 93 (1989).
- 335.- RAMESH, A.; KRISHNAMACHARYULU, J.; RAVINDRANATH, L.K.; BRAHMAJI RAO, S., *Analyst*, **117**, 1037 (1992).
- 336.- AGNIHOTRI, N.K.; SINGH, V.K.; SINGH, H.B., *Analyst*, **120**, 1809 (1995).
- 337.- FERNANDEZ ALBA, A.R.; MARTINEZ VIDAL, J.L.; AGUILERA, P.; FRENICHE, F.; AGÜERA, A., *Anal. Lett.*, **25**, 1581 (1992).
- 338.- GALLARDO MELGAREJO, A.; CANO PAVON, J.M.; RIOS CASTRO, A., *Anal. Chim. Acta*, **241**, 153 (1990).
- 339.- MORELLI, B., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **354**, 97 (1996).
- 340.- BERZAS NEVADO, J.J.; RODRIGUEZ FLORES, J.; VILLASEÑOR LLERENA, M.J., *Quim. Anal.*, **12**, 151 (1993).
- 341.- CRUCES BLANCO, C.; GARCIA CAMPAÑA, A.M.; ALES BARRERO, F., *Talanta*, **43**, 1019 (1996).
- 342.- MARTINEZ GALERA, M.; MARTINEZ VIDAL, J.L.; GARRIDO FRENICH, A.; PARRILLA VAZQUEZ, P., *J. AOAC Int.*, **78**, 423 (1995).
- 343.- TAHBOUB, Y.R.; PARDUE, H.L., *Anal. Chem.*, **57**, 38 (1985).
- 344.- BLANCO, M.; COELLO, J.; GONZALEZ, F.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S., *Anal. Chim. Acta*, **226**, 271 (1989).
- 345.- ANDREW, K.N.; WORSFOLD, P.J., *Analyst*, **119**, 141 (1994).
- 346.- MARTINEZ GALERA, M.; MARTINEZ VIDAL, J.L.; GARRIDO FRENICH, A.; PARRILLA, A., *Analyst*, **119**, 1189 (1994).
- 347.- ESPINOSA MANSILLA, A.; MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; SALINAS, F.; MARTINEZ GALERA, M., *Anal. Chim. Acta*, **276**, 141 (1993).
- 348.- BAUTISTA, R.D.; JIMENEZ, F.; JIMENEZ, A.I.; ARIAS, J.J., *Talanta*, **40**, 1687 (1993).
- 349.- SANCHEZ, E.; KOWALSKI, B.R., *J. Chemometrics*, **2**, 247 (1988).
- 350.- SANCHEZ, E.; KOWALSKI, B.R., *J. Chemometrics*, **2**, 265 (1988).

- 351.- BOOKSH, K.S.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **66**, 782A (1994).
- 352.- SAXBERG, B.E.H.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **51**, 1031 (1979).
- 353.- KALIVAS, J.H.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **55**, 532 (1983).
- 354.- FRANK, I.E.; KALIVAS, J.H.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **55**, 1800 (1983).
- 355.- OSTEN, D.W.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **57**, 908 (1985).
- 356.- RUYKEN, M.M.A.; VISSER, J.A.; SMILDE, A.K., *Anal. Chem.*, **67**, 2170 (1995).
- 357.- LLOBAT ESTELLES, M.; MAURI AUCEJO, A.R.; MARIN SAEZ, R.; SAN MARTIN CIGES, M.D.; CERDAN VIDAL, A., *Anal. Chim. Acta*, **282**, 671 (1993).
- 358.- MARTENS, H.; NAES, T. "Multivariate Calibration". Wiley (Chichester) (1989).
- 359.- KOWALSKI, B.R.; SEASHOLTZ, M.B., *J. Chemometrics*, **5**, 129 (1991).
- 360.- THOMAS, E.V., *Anal. Chem.*, **66**, 795A (1994).
- 361.- LIANG, Y.Z.; KVALHEIM, O.M.; MANNE, R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **18**, 235 (1993).
- 362.- THOMAS, E.V.; HAALAND, D.M., *Anal. Chem.*, **62**, 1091 (1990).
- 363.- LANG, P.M.; KALIVAS, J.H., *J. Chemometrics*, **7**, 153 (1993).
- 364.- KELLER, H.R.; ROTTELE, J.; BARTELS, H., *Anal. Chem.*, **66**, 937 (1994).
- 365.- SEASHOLTZ, M.B.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chim. Acta*, **277**, 165 (1993).
- 366.- MARK, H., *Appl. Spectrosc.*, **42**, 832 (1988).
- 367.- GEMPERLINE, P.J., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **15**, 115 (1992).
- 368.- SEKULIC, S.; SEASHOLTZ, M.B.; WANG, Z.; KOWALSKI, B.R.; LEE, S.E.; HOLT, B.R., *Anal. Chem.*, **65**, 835A (1993).
- 369.- WANG, Y.; VELTKAMP, D.J.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **63**, 2750 (1991).
- 370.- WANG, Y.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **65**, 1174 (1993).
- 371.- DE NOORD, O.E., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **25**, 85 (1994).
- 372.- BOUVERESSE, E.; MASSART, D.L.; DARDENNE, P., *Anal. Chem.*, **67**, 1381 (1995).
- 373.- BLANCO, M.; COELLO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; ROVIRA, E., *Appl. Spectrosc.*, **49**, 593 (1995).
- 374.- BROWN, C.W.; LYNCH, P.F.; OBREMSKI, R.J.; LAVERY, D.S., *Anal. Chem.*, **54**, 1472 (1982).
- 375.- KISNER, H.J.; BROWN, C.W.; KAVARNOS, G.J., *Anal. Chem.*, **55**, 1703 (1983).
- 376.- WEISBERG, S. "Applied Linear Regression". Wiley (New York) (1985).

- 377.- SEASHOLTZ, M.B.; ARCHIBALD, D.D.; LORBER, A.; KOWALSKI, B.R., *Appl. Spectrosc.*, **43**, 1067 (1989).
- 378.- TAULER, R.; IZQUIERDO RIDORSA, A.; CASASSAS, E., *Anal. Quim.*, **87**, 571 (1991).
- 379.- HAALAND, D.M.; EASTERLING, R.G., *Appl. Spectrosc.*, **34**, 539 (1980).
- 380.- IVALDI, J.C.; TRACY, D.; BARNARD, T.W.; SLAVIN, W., *Spectrochim. Acta*, **47B**, 1361 (1992).
- 381.- CERDA, V.; ESTELA, J.M.; FORTEZA, R.; CLADERA, A.; GOMEZ, E.; OMS, M.T., *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, **52**, 159 (1993).
- 382.- MARTENS, H.; NAES, T., *TRAC, Trends Anal. Chem.*, **3**, 204 (1984).
- 383.- JOCHUM, C.; JOCHUM, P.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **53**, 85 (1981).
- 384.- BERMOND, A.P., *Analisis*, **22**, 237 (1994).
- 385.- COOK, R.D.; WEISBERG, S. "Residuals and influence in Regression". Chapman and Hall (Londres) (1982).
- 386.- BECKMAN, R.J.; COOK, R.D., *Technometrics*, **25**, 119 (1983).
- 387.- WEI, W.Z.; ZHU, W.H.; YAO, S.Z., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **18**, 17 (1993).
- 388.- XIE, Y.L.; LIANG, Y.Z.; JIANG, J.H.; YU, R.Q., *Anal. Chim. Acta*, **313**, 185 (1995).
- 389.- DADO, G.; ROSENTHAL, J., *J. Chem. Educ.*, **67**, 797 (1990).
- 390.- HAALAND, D.M.; EASTERLING, R.G.; VOPICKA, D.A., *Appl. Spectrosc.*, **39**, 73 (1985).
- 391.- HENRION, G.; HENRION, R.; HEBISCH, R.; BOEDEN, B., *Anal. Chim. Acta*, **268**, 115 (1992).
- 392.- SAARINEN, P.; KAUPPINEN, J., *Appl. Spectrosc.*, **45**, 953 (1991).
- 393.- THOMAS, E.V., *Technometrics*, **33**, 405 (1991).
- 394.- HAALAND, D.M.; EASTERLING, R.G., *Appl. Spectrosc.*, **36**, 665 (1982).
- 395.- SUNDBERG, R.; BROWN, P.J., *Technometrics*, **31**, 365 (1989).
- 396.- DONAHUE, S.M.; BROWN, C.W.; CAPUTO, B.; MODELL, M.D., *Anal. Chem.*, **60**, 1873 (1988).
- 397.- BEEBE, K.R.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **59**, 1007A (1987).
- 398.- CAREY, W.P.; BEEBE, K.R.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **59**, 1529 (1987).
- 399.- NAES, T.; MARTENS, H.; *TRAC, Trends Anal. Chem.*, **3**, 266 (1984).
- 400.- MARIS, M.A.; BROWN, C.W.; LAVERY, D.S., *Anal. Chem.*, **55**, 1694 (1983).
- 401.- MARBACH, R.; HEISE, H.M., *TRAC, Trends Anal. Chem.*, **11**, 270 (1992).

- 402.- HONIGS, D.E.; FREELIN, J.M.; HIEFTJE, G.M.; HIRSCHFELD, T.B., *Appl. Spectrosc.*, **37**, 491 (1983).
- 403.- KOWALSKI, K.G., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **9**, 177 (1990).
- 404.- JOUAN-RIMBAUD, D.; KHOTS, M.S.; MASSART, D.L.; LAST, I.R.; PREBBLE, K.A., *Anal. Chim. Acta*, **315**, 257 (1995).
- 405.- HAALAND, D.M., *Spectroscopy*, **2**, 56 (1987).
- 406.- SUNDBERG, R., *Statistics & Probability Letters*, **3**, 75 (1985).
- 407.- KALMAN, R.E., *J. Basic Eng.*, **82**, 35 (1960).
- 408.- BROWN, S.D., *Anal. Chim. Acta*, **181**, 1 (1986).
- 409.- RUTAN, S.C., *J. Chemometrics*, **1**, 7 (1987).
- 410.- RUTAN, S.C., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **6**, 191 (1989).
- 411.- RUTAN, S.C., *J. Chemometrics*, **4**, 103 (1990).
- 412.- BROWN, S.D., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **10**, 87 (1991).
- 413.- ERICKSON, C.L.; LYSAGHT, M.J.; CALLIS, J.B., *Anal. Chem.*, **64**, 1155A (1992).
- 414.- LIU, Y.M.; YU, R.Q., *Talanta*, **35**, 707 (1988).
- 415.- LAVAGNINI, I.; PASTORE, P.; MAGNO, F., *Anal. Chim. Acta*, **239**, 95 (1990).
- 416.- RUTAN S.C., *Anal. Chem.*, **63**, 1103A (1991).
- 417.- RUTAN S.C.; BROWN, S.D., *Anal. Chim. Acta*, **167**, 39 (1985).
- 418.- AGBODJAN, A.A.; RUTAN S.C., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **24**, 137 (1994).
- 419.- LORBER, A.; WANGEN, L.; KOWALSKI, B.R., *J. Chemometrics*, **1**, 19 (1987).
- 420.- WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2**, 37 (1987).
- 421.- GELADI, P.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chim. Acta*, **185**, 1 (1986).
- 422.- HOSKULDSSON, A., *J. Chemometrics*, **2**, 211 (1988).
- 423.- HELLAND, I.S., *Commun. Statist.-Simula.*, **17**, 581 (1988).
- 424.- MANNE, R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2**, 187 (1987).
- 425.- LORBER, A.; KOWALSKI, B.R., *Appl. Spectrosc.*, **44**, 1464 (1990).
- 426.- FABER, N.M.; BUYDENS, L.M.C.; KATEMAN, G., *Anal. Chim. Acta*, **296**, 1 (1994).
- 427.- WOLD, S., *Technometrics*, **20**, 397 (1978).
- 428.- EASTMENT, H.T.; KRZANOWSKI, W.J., *Technometrics*, **24**, 73 (1982).

- 429.- OSTEN, D.W., *J. Chemometrics*, **2**, 39 (1988).
- 430.- GRUNG, B.; KVALHEIM, O.M., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **22**, 115 (1994).
- 431.- DE JONG, S., *J. Chemometrics*, **7**, 551 (1993).
- 432.- JANCAR, L.; WEGSCHEIDER, W., *Anal. Chim. Acta*, **248**, 459 (1991).
- 433.- DE NOORD, O.E., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **23**, 65 (1994).
- 434.- SEASHOLTZ, M.B.; KOWALSKI, B.R., *J. Chemometrics*, **6**, 103 (1992).
- 435.- LORBER, A.; FABER, K.; KOWALSKI, B.R., *J. Chemometrics*, **10**, 215 (1996).
- 436.- HOERL, A.E.; KENNARD, R.W., *Technometrics*, **12**, 55 (1970).
- 437.- HOERL, A.E.; KENNARD, R.W., *Technometrics*, **12**, 69 (1970).
- 438.- SMITH, G.; CAMPBELL, F., *J. Amer. Statist. Assoc.*, **75**, 74 (1980).
- 439.- NYDEN, M.R.; FORNEY, G.P.; CHITTUR, K., *Appl. Spectrosc.*, **42**, 588 (1988).
- 440.- HOLMAN, D.A.; THOMPSON, A.W.; BENNETT, D.W.; OTVOS, J.D., *Anal. Chem.*, **66**, 1378 (1994).
- 441.- MASON, R.L., *Commun. Statist.- Theor. Meth.*, **15**, 2651 (1986).
- 442.- NAES, T.; ISAKSSON, T.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **62**, 664 (1990).
- 443.- NAES, T.; ISAKSSON, T., *Appl. Spectrosc.*, **46**, 34 (1992).
- 444.- WANG, Z.; ISAKSSON, T.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **66**, 249 (1994).
- 445.- NAES, T.; ISAKSSON, T., *NIR News*, **5**, 7 (1994).
- 446.- MALINOWSKI, E.R.; HOWERY, D. "Factor Analysis in Chemistry". Wiley (New York) (1980).
- 447.- HAMILTON, J.C.; GEMPERLINE, P.J., *J. Chemometrics*, **4**, 1, (1990).
- 448.- REN, Y.; ZHANG, P.X., *Anal. Chim. Acta*, **222**, 323 (1989).
- 449.- BLANCO, M.; CERDA, V.; COELLO, J.; GENE, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S., *Anal. Lett.*, **25**, 543 (1992).
- 450.- GEMPERLINE, P.J.; LONG, J.R.; GREGORIOU, V.G., *Anal. Chem.*, **63**, 2313 (1991).
- 451.- BLANK, T.B.; BROWN, S.D., *Anal. Chem.*, **65**, 3081 (1993).
- 452.- BLANCO, M.; COELLO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; REDON, M., *Anal. Chem.*, **67**, 4477 (1995).
- 453.- BHANDARE, P.; MENDELSON, Y.; PEURA, R.A.; JANATSCH, G.; KRUSE-JARRES, J.D.; MARBACH, R.; HEISE, H.M., *Appl. Spectrosc.*, **47**, 1214 (1993).

- 454.- LORBER, A.; KOWALSKI, B.R., *J. Chemometrics*, **2**, 93 (1988).
- 455.- KARSTANG, T.V.; TOFT, J.; KVALHEIM, O.M., *J. Chemometrics*, **6**, 177 (1992).
- 456.- GUIBERTEAU, A.; GALEANO DIAZ, T.; SALINAS, F.; ORTIZ, J.M., *Anal. Chim. Acta*, **305**, 219 (1995).
- 457.- ISAKSSON, T.; KOWALSKI, B.R., *Appl. Spectrosc.*, **47**, 702 (1993).
- 458.- ADHIHETTY, I.S.; MCGUIRE, J.A.; WANGMANEERAT, B.; NIEMCZYK, T.M.; HAALAND, D.M., *Anal. Chem.*, **63**, 2329 (1991).
- 459.- DONAHUE, S.M.; BROWN, C.W.; SCOTT, M.J., *Appl. Spectrosc.*, **44**, 407 (1990).
- 460.- BEAR, R.S., Jr.; BROWN, S.D., *Anal. Chem.*, **65**, 1169 (1993).
- 461.- MACLAURIN, P.; WORSFOLD, P.J.; NORMAN, P.; CRANE, M., *Analyst*, **118**, 617 (1993).
- 462.- WHITMAN, D.A.; SEASHOLTZ, M.B.; CHRISTIAN, G.D.; RUZICKA, J.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chem.*, **63**, 775 (1991).
- 463.- OTTO, M.; WEGSCHEIDER, W., *Anal. Chem.*, **57**, 63 (1985).
- 464.- YONGNIAN, N.; KOKOT, S.; SELBY, M.; HODGKINSON, M., *Electroanalysis*, **4**, 713 (1992).
- 465.- BLANCO, M.; COELLO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; RIBA, J., *Anal. Chem.*, **66**, 2905 (1994).
- 466.- BLANCO, M.; COELLO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; REDON, M., *Anal. Chim. Acta*, **303**, 309 (1995).
- 467.- KELLER, H.R.; RÖTTELE, J.; BARTELS, H., *Anal. Chem.*, **66**, 937 (1994).
- 468.- NAES, T.; ISAKSSON, T., *Appl. Spectrosc.*, **43**, 328 (1989).
- 469.- NAES, T.; ISAKSSON, T., *NIR News*, **5**, 16 (1994).
- 470.- BRERETON, R.G. "Chemometrics: Applications of Mathematics and Statistics to Laboratory Systems". Ellis Horwood (Londres) (1990).
- 471.- NAES, T., *J. Chemometrics*, **1**, 121 (1987).
- 472.- PUCHWEIN, G., *Anal. Chem.*, **60**, 569 (1988).
- 473.- HITCHCOCK, K.; KALIVAS, J.H.; SUTTER, J.M., *J. Chemometrics*, **6**, 85 (1992).
- 474.- FERRE, J.; RIUS, X., *Anal. Chem.*, **68**, 1565 (1996).
- 475.- BROWN, P.J., *J.R. Statist. Soc. B*, **44**, 287 (1982).
- 476.- FULLER, M.P.; RITTER, G.L.; DRAPER, C.S., *Appl. Spectrosc.*, **42**, 217 (1988).
- 477.- ESPINOSA MANSILLA, A.; SALINAS, F.; DE ORBE PAYA, I., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **354**, 245 (1996).

- 478.- ROSSI, D.T.; PARDUE, H.L., *Anal. Chim. Acta*, **175**, 153 (1985).
- 479.- LIANG, Y.Z.; XIE, Y.L.; YU, R.Q., *Anal. Chim. Acta*, **222**, 347 (1989).
- 480.- LORBER, A.; KOWALSKI, B.R., *J. Chemometrics*, **2**, 67 (1988).
- 481.- LUCASIUS, C.B.; BECKERS, M.L.M.; KATEMAN, G., *Anal. Chim. Acta*, **286**, 135 (1994).
- 482.- SUSTEK, J. *Anal. Chem.*, **46**, 1676 (1974).
- 483.- SALAMIN, P.A.; BARTELS, H.; FORSTER, P., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **11**, 57 (1991).
- 484.- BROWN, P.J., *J. Chemometrics*, **6**, 151 (1992).
- 485.- JOUAN-RIMBAUD, D.; WALCZAK, B.; MASSART, D.L.; LAST, I.R.; PREBBLE, K.A., *Anal. Chim. Acta*, **304**, 285 (1995).
- 486.- MONFRE, S.L.; BROWN, S.D., *Appl. Spectrosc.*, **46**, 1711 (1992).
- 487.- KALIVAS, J.H., *Anal. Chem.*, **55**, 565 (1983).
- 488.- KALIVAS, J.H.; LANG, P., *J. Chemometrics*, **3**, 443 (1989).
- 489.- FRANS, S.D.; HARRIS, J.M., *Anal. Chem.*, **57**, 2680 (1985).
- 490.- THIJSEN, P.C.; VOGELS, L.J.P.; SMIT, H.C.; KATEMAN, G., *Fresenius Z Anal. Chem.*, **320**, 531 (1985).
- 491.- JUHL, L.L.; KALIVAS, J.H., *Anal. Chim. Acta*, **207**, 125 (1988).
- 492.- LORBER, A., *Anal. Chem.*, **58**, 1167 (1986).
- 493.- GARRIDO FRENICH, A.; JOUAN-RIMBAUD, D.; MASSART, D.L.; KUTTATHARMMAKUL, S.; MARTINEZ GALERA, M.; MARTINEZ VIDAL, J.L., *Analyst*, **120**, 2787 (1995).
- 494.- BJORSVIK, H.R.; BYE, E., *Appl. Spectrosc.*, **45**, 771 (1991).
- 495.- KUBAN, V., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **23**, 15 (1992).
- 496.- MACLAURIN, P.; WORSFOLD, P.J., *Microchem. J.*, **45**, 178 (1992).
- 497.- SCOLARI, C.A.; BROWN, S.D., *Anal. Chim. Acta*, **178**, 239 (1985).
- 498.- GUZMAN, M.; RUZICKA, J.; CHRISTIAN, G.D.; SHELLEY, P., *Vib. Spectrosc.*, **2**, 1 (1991).
- 499.- NAVAS DIAZ, A.; GONZALEZ GARCIA, J.A., *Anal. Chem.*, **66**, 988 (1994).
- 500.- PORTER, N.; HART, B.T.; MORRISON, R.; HAMILTON, I.C., *Anal. Chim. Acta*, **308**, 313 (1995).
- 501.- QUENCER, B.M.; CROUCH, S.R., *Anal. Chem.*, **66**, 458 (1994).
- 502.- GARCIA, J.M.; JIMENEZ, A.I.; ARIAS, J.J.; KHALAF, K.D.; MORALES RUBIO, A.; DE LA GUARDIA, M., *Analyst*, **120**, 313 (1995).

- 503.- CLADERA, A.; GOMEZ, E.; ESTELA, J.M.; CERDA, V.; ALVAREZ OSSORIO, A.; RINCON, F.; SALVA, F., *Inter. J. Anal. Chem.*, **45**, 143 (1991).
- 504.- ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; KRUG, F.J.; REIS, B.F.; BRUNS, R.E.; ARAUJO, M.C.U., *Anal. Chim. Acta*, **145**, 169 (1983).
- 505.- BLANCO, M.; COELLO, J.; GENE, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S., *Quim. Anal.*, **8**, 223 (1989).
- 506.- BLANCO, M.; COELLO, J.; GENE, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S., *Anal. Chim. Acta*, **224**, 23 (1989).
- 507.- LUKKARI, I.; LINDBERG, W., *Anal. Chim. Acta*, **211**, 1 (1988).
- 508.- ERICKSON, B.C.; RUZICKA, J.; KOWALSKI, B.R., *Anal. Chim. Acta*, **218**, 303 (1989).
- 509.- GEMPERLINE, P.J.; HAMILTON, J.C., *J. Chemometrics*, **3**, 455 (1989).
- 510.- MALINOWSKI, E.R., *J. Chemometrics*, **6**, 29 (1992).
- 511.- GOMEZ, E.; TOMAS, C.; CLADERA, A.; ESTELA, J.M.; CERDA, V., *Analyst*, **120**, 1181 (1995).
- 512.- ESPINOSA MANSILLA, A.; SALINAS, F.; ZAMORO, A., *Analyst*, **119**, 1183 (1994).
- 513.- HERNANDEZ, O.; JIMENEZ, F.; JIMENEZ, A.I.; ARIAS, J.J., *Analyst*, **121**, 169 (1996).
- 514.- HERNANDEZ, O.; JIMENEZ, A.I.; JIMENEZ, F.; ARIAS, J.J.; HAVEL, J., *Anal. Chim. Acta*, **320**, 177 (1996).
- 515.- BECHMANN, I.E.; NORGAARD, L.; RIDDER, C., *Anal. Chim. Acta*, **304**, 229 (1995).
- 516.- SAURINA, J.; HERNANDEZ CASSOU, S., *Analyst*, **120**, 305 (1995).
- 517.- GOMEZ, E.; CLADERA, A.; ESTELA, J.M.; CERDA, V., *Talanta*, **40**, 1601 (1991).
- 518.- POPPI, R.J.; PASQUINI, C., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **19**, 243 (1993).
- 519.- CARABIAS MARTINEZ, R.; RODRIGUEZ GONZALO, E.; SANTIAGO TORIBIO, M.P.; HERNANDEZ MENDEZ, J., *Anal. Chim. Acta*, **321**, 147 (1996).
- 520.- RIDDER, C.; NORGAARD, L., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **14**, 297 (1992).
- 521.- BLANCO, M.; COELLO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; REDON, M.; RIBA, J., *Anal. Chim. Acta*, **259**, 219 (1992).
- 522.- LINDBERG, W.; CLARK, G.D.; HANNA, C.P.; WHITMAN, D.A.; CHRISTIAN, G.D.; RUZICKA, J., *Anal. Chem.*, **62**, 849 (1990).
- 523.- BLANCO, M.; COELLO, J.; GENE, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **338**, 831 (1990).
- 524.- SLAMA, M.; ZABOROSCH, C.; WIENKE, D.; SPENER, F., *Anal. Chem.*, **68**, 3845 (1996).

- 525.- HONIGS, D.E.; HIEFTJE, G.M.; MARK, H.L.; HIRSCHFELD, T.B., *Anal. Chem.*, **57**, 2299 (1985).
- 526.- EDGERTON, T.R.; MOSEMAN, R.F.; LORES, E.M.; WRIGHT, L.H., *Anal. Chem.*, **52**, 1774 (1980).
- 527.- REICHARDT, C. "Solvent and Solvent Effects in Organic Chemistry". UCH (Weinheim) (1990).
- 528.- HAALAND, D.M.; THOMAS, E.V., *Anal. Chem.*, **60**, 1193 (1988).
- 529.- McCULLOCH, C.E.; MEETER, D., *Technometrics*, **25**, 152 (1983).